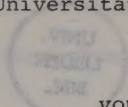


Aus dem Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs des Fachbereichs für Tiermedizin der Universität München

Vorstände: Prof. Dr. Dr. h.c. L. Kotter und
Prof. Dr. G. Terplan

UNTERSUCHUNG ÜBER DAS VORKOMMEN VON AUSTRALIA-ANTIGEN
BEI SCHLACHTRINDERN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs für Tiermedizin der Ludwig-Maximilians
Universität München



von
Brigitte Handlos
aus
München

München 1974

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin der
Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. L. Kotter
Korreferent: Prof. Dr. H. Mahnel

Tag der Promotion: 21. Februar 1975



Inhaltsverzeichnis

Seite

Einleitung	1
Literatur	2
1. Historischer Überblick über den Begriff der infektiösen Hepatitis	2
2. Hepatitis-B-Antigen	4
2.1. Entdeckung des Australia-Antigens	4
2.2. Vorkommen des Australia-Antigens	5
2.3. Eigenschaften des Australia-Antigens	5
2.4. Problematik des Nachweises von Australia-Antigen	7
2.5. Zuordnung des Australia-Antigens zur Serumhepatitis	8
2.6. Australia-Antigen und Leberenzyme	10
2.7. Nachweismethoden	11
3. Hepatitis-A-Antigen	14
Eigene Untersuchungen	15
1. Gewinnung des Untersuchungsmaterials	15
2. Methodik	15
2.1. Makroskopische Leberuntersuchung	15
2.2. Histologische Leberuntersuchung	16
2.3. Untersuchung der Leberenzymaktivitäten	16
2.31 Bestimmung der SGOT	19
2.32 Bestimmung der SGPT	21
2.33 Messung der GLDH	22
2.4. Agar-Gel-Diffusions-Test	23
2.5. Latex-Agglutinations-Test	26
Ergebnisse	29
Besprechung und Diskussion der Ergebnisse	37

Schlussbetrachtung

45

Zusammenfassung

47

Summary

49

Literaturverzeichnis

51

Lebenslauf

E i n l e i t u n g

Erkrankungen des Menschen an dem im Bundesseuchengesetz erfaßten Krankheitskomplex der "Hepatitis infectiosa" werden in Wirklichkeit durch zwei verschiedene Virusinfektionen mit ähnlichen klinischen Symptomen verursacht. In der Bundesrepublik Deutschland werden unter diesem Sammelbegriff jährlich etwa 23.000 Fälle registriert. Damit stehen die durch Viren bedingten Lebererkrankungen in der Häufigkeitsstatistik der meldepflichtigen Krankheiten hinter 31.000 Scharlachfällen an vorderster Stelle. Erst dann folgen Infektionen durch Erreger der Typhus-Paratyphus-Enteritis-Gruppe mit ca. 11.000 Fällen (44), obwohl nur ein Bruchteil der Erkrankungen erkannt und gemeldet wird (Schätzungen zufolge liegt die Zahl der tatsächlichen Erkrankungsfälle bei etwa 150.000 (55)).

Bis heute fehlen noch genaue Kenntnisse der Infektionsquellen und -wege dieser Erkrankungen. Fest steht nur, daß neben einer parenteralen Übertragung z.B. durch Injektionen von Medikamenten und Bluttransfusionen (Serum- oder Impfhepatitis) auch eine Ansteckung auf oralem Wege erfolgen kann. Hierbei spielen vor allem infiziertes Wasser und Schalentiere (Muscheln, Austern) eine wesentliche Rolle (Nahrungsmittelhepatitis).

Im Rahmen der Überprüfung einheimischer Nahrungsmittel tierischer Herkunft auf das mögliche Vorhandensein von Erregern der Hepatitis erhielt ich die Aufgabe, Schlachtrinder serologisch auf eine eventuelle Trägerschaft zu untersuchen.

L i t e r a t u r

1. Historischer Überblick über den Begriff der infektiösen Hepatitis

Das Krankheitsbild einer ansteckenden Leberentzündung ist in Mitteleuropa schon seit dem vorigen Jahrhundert bekannt. Allerdings konnte sich die Diagnose bis in neuere Zeit nur auf das Hauptsymptom der Krankheit, den Ikterus, stützen. Grundlegende Untersuchungen zur Erforschung der Ätiologie dieser Krankheit stellte bereits Ende des vorigen Jahrhunderts WEIL (84) an, dem es gelang, als Erreger einer "ansteckenden Leberentzündung mit Ikterus" Leptospiren (*L. ictero-haemorrhagica*) zu isolieren. In vielen Fällen jedoch mißlang der Nachweis von Leptospiren, ebensowenig konnten andere Bakterien als Ursache der "Gelbsucht" nachgewiesen werden. Nachdem LÖFFLER im Jahre 1883 zum ersten Mal ein Agens von Viruscharakter (45) als Krankheitsursache nachweisen konnte (MKS-Virus), suchte man nach einem dieser ultravisiblen Erreger als mögliche Infektionsursache der Hepatitis.

Durch die moderne Enzymdiagnostik und die Möglichkeit einer Leberbiopsie gelang es, eine große Anzahl der ansteckenden Hepatitiden festzustellen, die bis dahin - weil anikterisch verlaufend - nicht diagnostiziert wurden. Auch hier konnte keine bakterielle Ursache ermittelt werden. Im klinischen Sprachgebrauch wird heute der ganze Krankheitskomplex ikterischer und anikterischer ansteckender Leberentzündungen nichtbakterieller Natur (also mit Ausnahme des Leptospirose-Komplexes) als "Hepatitis epidemica s. infectiosa s. contagiosa s. Virushepatitis" bezeichnet (5, 20). Unter der Bezeichnung "Hepatitis infectiosa" wurde die Krankheit am 18.7.1961 in das neue Bundesseuchengesetz unter die meldepflichtigen Krankheiten aufgenommen (§§ 3 (2) Nr. 4 und 17a (1)).

Der Begriff "Hepatitis infectiosa" umfaßt aber zwei schwer voneinander abgrenzbare Krankheitsformen, die klinisch zwar

ähnliche Krankheitsbilder aufweisen, sich aber in der Länge der Inkubationszeiten und dem Übertragungsweg des Erregers unterscheiden.

Die sog. Serumhepatitis (SH, Hepatitis B, Inokulationshepatitis, Transfusionshepatitis, Impfhepatitis) wird vorwiegend durch kleinste Blutmengen von Hepatitiskranken oder gesunden Virusträgern (z.B. Blutspendern) übertragen, aber auch durch Eindringen des infektiösen Agens in Wunden oder durch ärztliche bzw. zahnärztliche Manipulation (Impfungen, Operationen). Der Zeitpunkt der Infektion ist schwer zu bestimmen. Neben dem Alter des Empfängers spielt auch der Applikationsmodus des infizierten Serums oder Impfstoffs eine Rolle. Die Inkubationszeit schwankt zwischen 60 und 150 Tagen (52). Nach anderen Angaben beträgt bei infizierten Jugendlichen die Inkubation 41 - 69 Tage nach intramuskulärer Verabreichung und 88 - 108 Tage bei oraler Infektion (41, 42). Jedoch ist auch eine Übertragung von Person zu Person möglich. Neueste Untersuchungen haben gezeigt, daß auch Urin, Stuhl und Wäsche von Erkrankten als infektiös angesehen werden müssen (7, 15, 68, 69, 78, 79).

Der Serumhepatitis gegenüber steht die Nahrungsmittelhepatitis (IH, Hepatitis A, infektiöse Hepatitis, Hepatitis epidemica). Eintrittspforte ist fast ausschließlich der Intestinaltrakt, die Inkubationszeit ist mit ca. 15 - 45 Tagen erheblich kürzer. Sie wird beim Genuß von infizierten Lebensmitteln wie Wasser, roher Milch, Austern und Fleischerzeugnissen (5, 6, 21, 27, 74) übertragen.

Die Frage, von welchem Virus die Hepatitis verursacht wird, warf jedoch große Probleme auf. Immer wieder wurden Viren aus dem Blut von Hepatitiskranken isoliert. Mit keinem dieser Stämme konnte jedoch experimentell eine Hepatitis ausgelöst werden (37). Man suchte deshalb nach "Kandidatenstämmen", deren physikalische, chemische und serologische Eigenschaften denen des Erregers besonders nahe kamen. 1963 wurde von der Weltgesundheitsbehörde WHO eine Liste solcher

Kandidatenstämme herausgegeben. Sie reichte von Adeno-Viren über Myxo-Viren, Entero-Viren, Corona-Viren bis zu Herpes-Viren (31, 37).

Inzwischen wurde von FEINSTONE und Mitarb. im Stuhl von Patienten ein Antigen mit Viruseigenschaften durch Immuno-Elektronen-Mikroskopie dargestellt, welches im Zusammenhang mit akuten Nahrungsmittelinfektionen auftrat. Weitere Untersuchungen ergaben Anhaltspunkte für die Einordnung der dargestellten Partikel zu den Parvo-Viren (25, 26).

2. Hepatitis-B-Antigen

2.1. Entdeckung des Australia-Antigens

Einen neuen Impuls bekam die Hepatitisforschung, als die amerikanischen Forscher ALLISON und BLUMBERG 1961 im Rahmen genetischer Untersuchungen durch Zufall im Serum von mehrfach transfundierten Hämophilen Antikörper gegen ein Lipo-Protein-Antigen eines australischen Ureinwohners entdeckten. Dieses Antigen wurde dann gehäuft bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen wie Leukämie, Mongolismus, Lepra und auch infektiöser Hepatitis nachgewiesen (2). Aufgrund der "Erstentdeckung" bei einem australischen Eingeborenen erhielt es die Bezeichnung "Australia-Antigen". Es fiel auf, daß viele Patienten, in deren Serum Australia-Antigen nachgewiesen werden konnte, ein- oder mehrmals Bluttransfusionen erhalten hatten. So wurde schon wenig später von verschiedenen Forschern (29, 56, 60, 61) und auch von BLUMBERG (17) selbst nachgewiesen, daß dieses Australia-Antigen mit der Hepatitis-B assoziiert ist. Neben der Bezeichnung "Australia-Antigen" sind heute auch die Bezeichnungen "Hepatitis-Assoziiertes-Antigen" (HAA) oder "Australia/Serum-Hepatitis-Antigen" (Au/SH-Antigen) gebräuchlich.

2.2. Vorkommen des Australia-Antigens

Auffassungen, es handle sich beim Australia-Antigen "um das Virus selbst", ein Hüllprotein oder um ein anderes infektiöses Agens" sind noch nicht endgültig bestätigt worden. Seine hohe Koinzidenz mit der Serum-Hepatitis macht seine Verwendung für den diagnostischen Test bei Blutspendern unentbehrlich, nicht zuletzt auch zur Vermeidung von Infektionen durch Übertragungen (53).

Sowohl in Amerika als auch in Japan und Europa wurden Hunderte von Patienten und Blutspendern auf das Vorhandensein von Australia-Antigen getestet. 1969 berichten KAPLAN und GRADY (35) sowie LONDON und Mitarb. (46), daß das Australia-Antigen hauptsächlich bei Patienten mit Virushepatitis B nachgewiesen werden konnte, nicht jedoch bei Patienten mit anderen Lebererkrankungen (37, 46). Der Prozentsatz der HAA-positiven Patienten lag außerdem bei aufgrund der Anamnese vermuteter Serumhepatitis höher (34 %) als bei der Nahrungsmittelhepatitis (13 %). Unterschiede in bezug auf das Geschlecht der Patienten wurden nicht gefunden. Bei Patienten unter 20 Jahren trat das Australia-Antigen nur sehr selten auf (14). In Europa und den USA waren 0,1 bis 0,4 % der gesunden Bevölkerung Australia-Antigen-positiv, in Südost-Asien waren es 4 bis 13 %.

2.3. Eigenschaften des Australia-Antigens

Die Strukturanalyse des Australia-Antigens sowie seine Beziehungen zur epidemischen Hepatitis und Leukämie sind seit BLUMBERG und Mitarb. (17) Gegenstand der Forschung. Die Erkenntnis, daß es sich dabei um ein spezifisches Antigen handelt, wurde durch MELARTIN und BLUMBERG (49) gefördert, als es 1966 gelang, Antikörper mit Hilfe von positiven Humanseren in Kaninchen zu erzeugen. Kaninchenserum sind noch heute das Ausgangsmaterial zur Testung von Patientenserum auf Australia-Antigen. Das Australia-Antigen selbst konnte mit

Hilfe von Ultrazentrifugation in Caesiumchlorid aus dem Serum isoliert werden (1, 14). Es wurde inzwischen auch elektronen-optisch dargestellt. Dabei wurden morphologisch unterschiedliche Partikel gefunden, nämlich runde Partikel mit einem Durchmesser von 19 - 21 nm und 3 nm großen Untereinheiten an der Oberfläche (9, 10, 12, 34), zum anderen Partikel von filamentöser Form mit einem Durchmesser von 18 - 21 nm und einer Länge von 0 bis 230 nm (10, 12). DANE und Mitarb. (23) fanden außerdem in drei Hepatitisseren größere Partikel von 42 nm Durchmesser, die eine Doppelmembran und einen zentralen Kern aufwiesen.

HIRSCHMANN und Mitarb. (32, 75) entdeckten im Australia-Antigen eine "Reverse Transcriptase" und unterstellten, daß das Antigen mit einem RNS-Virus assoziiert sei, wofür ein geringfügiger Anstieg der RNS im Antigen spräche. Ob hieraus mit SIRTORI (75) gefolgert werden kann, daß das Australia-Antigen auch eine RNS-Polymerase zur Bildung von lipidumhüllten Viruspartikeln enthalten könnte, ist bis jetzt ebenfalls noch ungeklärt. Zur Frage, inwieweit das Australia-Antigen Virusbestandteil, virusartig (virus-like) (17) oder gar identisch mit einem Virus ist (68), wird in dieser Arbeit nichts gesagt. Biochemisch ist es ein Lipoprotein. Bei der Elektrophorese verhält es sich wie ein Alpha-Globulin. Es ist relativ resistent gegenüber physikalischen und chemischen Einwirkungen.

Zu seinen immunologischen Eigenschaften zählt, daß bisher keine Kreuzreaktionen der Anti-HAA-Antikörper mit anderen Antigenen bekannt sind (14). Im Verlauf einer Hepatitis sind häufig temporär zirkulierende Antigen-Antikörper-Komplexe nachweisbar. Die Antikörperbildung beim Menschen nach Infektion mit Australia-Antigen ist sehr schwach, wogegen bei der Immunisierung von Tieren (Kaninchen, Meerschweinchen) mittels Australia-Antigen-haltigem Serum eine starke Antikörperproduktion auftritt (1, 14, 49). Es ist bisher auch nicht gelungen, das Antigen in herkömmlichen Versuchstieren oder Zellkulturen anzuzüchten. Lediglich bei Menschenaffen

(Schimpansen, Patasaffen) wurde durch Überimpfung von Serum hepatitisinfizierter Menschen, das auf Australia-Antigen positiv reagiert hatte, eine der menschlichen Hepatitis vergleichbare Krankheit hervorgerufen (48).

Australia-Antigen-positives Serum blieb beim Erhitzen auf 60° C bis über eine Stunde infektiös, muß also ein infektiöses Agens enthalten haben. Gegenüber tiefen Temperaturen (minus 200° C bis zu zwei Jahren) sowie Äther, Chlor, Formalin, Äthanol und Phenol waren derartige Seren sogar resistent (1, 3, 33, 55, 72). Benzalkoniumchlorid (Mefarol-R-Bayer) hebt die Infektiosität auf (33).

2.4. Problematik des Nachweises von Australia-Antigen

Australia-Antigen wurde sowohl bei Patienten mit festgestellter Serumhepatitis als auch bei solchen mit vermuteter epidemischer Hepatitis festgestellt. Neben BLUMBERG (17) bestätigen dies auch eine Reihe anderer voneinander unabhängiger Autoren (14, 56, 60). MAUGH zufolge handelt es sich bei Patienten mit Nahrungsmittelhepatitis und positivem Australia-Antigen-Nachweis um eine Sekundärinfektion mit Serumhepatitis (48).

Der Prozentsatz der HAA-positiven Patienten ist bei nachgewiesener Serumhepatitis allerdings höher (bis zu 95 %) als bei angeblicher epidemischer Hepatitis (bis zu 47 %) (14). Dies soll mit dem Zeitpunkt der Blutabnahme zusammenhängen (14). BLUMBERG und Mitarb. (16) fanden in ihren Untersuchungen, daß das Australia-Antigen i.d.R. nur kurze Zeit, und zwar zu Beginn der Krankheit im Serum nachweisbar ist. Einige Autoren (14, 27) sehen darin eine Erklärung, warum das Australia-Antigen bei der Serumhepatitis mit einer wesentlich längeren Inkubationszeit und besser zu verfolgendem Infektionsweg öfter nachgewiesen werden kann als bei einer "epidemischen Hepatitis". Außerdem wurde auch bei der Serumhepatitis der Prozentsatz der positiven Fälle um so höher,

je öfter in der akuten Phase Blutproben entnommen und untersucht wurden (80 %). Bei sporadischen Blutentnahmen war der Prozentsatz wesentlich geringer (20 %) (11). Eine Persistenz des Australia-Antigens nach der akuten Phase deutet auf eine Chronifizierung des Prozesses hin (11, 14). Nicht beachtet wurde jedoch die inzwischen bekannte Möglichkeit einer massiven oralen Ansteckung mit dem Virus der Serumhepatitis, die, eine epidemische Hepatitis vortäuschend, auch mit einem Vorkommen von Australia-Antigen im Serum verbunden sein kann (41, 79).

2.5. Zuordnung des Australia-Antigens zur Serumhepatitis

Die Einstufung des "Australia-Antigens" als Isopräzipitin bei einigen äthiologisch sehr verschiedenen Krankheiten erlaubte zunächst keine Zuordnung zu einem bestimmten infektiösen Agens. Die fast immer bei Australia-Antigen-positiven Fällen vorausgegangenen Blut- oder Serumtransfusionen lenkten den Verdacht auf simultan auftretende entzündliche Leberveränderungen. Klinische Überprüfungen von Hepatitis-Erkrankungen bestätigen, daß sich das Antigenvorkommen vorwiegend auf aktiv akute Prozesses, mitunter auch auf "chronisch-aggressive" Fälle konzentrierte. Hinzu kam die Erkenntnis, daß es sich dabei um die über ein eigenes Erregerreservoir verfügende Serumhepatitis und nicht um die Nahrungsmittelhepatitis handelte. Den Beweis für eine eindeutige Zuordnung des Australia-Antigens zu der Serumhepatitis wurde vor allem durch die Untersuchungen von KRUGMAN und Mitarb. (41, 42) erbracht. Geistig zurückgebliebende Kinder der Willowbrook-State-School im Alter von ein bis zehn Jahren wurden experimentell mit zwei verschiedenen Serumgruppen von Hepatitis-kranken infiziert. Es ergaben sich unterschiedliche Inkubationszeiten; eine Kurzzeit-Inkubation von 35 - 47 Tagen stand einer Langzeit-Inkubation von 41 - 108 Tagen gegenüber. Die hieraus entstehenden Hepatitis-Infektionen konnten oral, intramuskulär und parenteral übertragen werden. Für

die später als Serumhepatitis ausgewiesene Erkrankungsform mußte aber eine bis zu 50fach höhere Dosis für die Erzeugung einer oralen Hepatitis verwendet werden. Das gleiche Serum erzeugte bei intramuskulärer Applikation Leberentzündungen nach einer Inkubationszeit von 41 - 69 Tagen, die Unterscheidung der Serumhepatitis von der epidemischen Form gelang aber letzten Endes nur durch den Nachweis des HAA. Nur Kinder, die mit Serumhepatitis infiziert waren, hatten das Antigen im Serum, das bereits vor den ersten klinischen und biochemischen Anzeichen der Hepatitis nachzuweisen war. Antikörper konnten in keinem Stadium der Erkrankung festgestellt werden. Eine heterologe Immunität bestand nicht. Kinder, die eine Serumhepatitis durchgemacht hatten, konnten später mit Erfolg mit epidemischer Hepatitis infiziert werden. Nach einer überstandenen Serumhepatitis wurde jedoch eine Immunität gegenüber einer Zweitinfektion mit dem gleichen Agens erworben. Neben anderen Autoren haben auch PROVOST und Mitarb. (63) inzwischen das streng obligate Vorkommen des HAA mit der Serumhepatitis unterstrichen.

Da, wie man heute weiß, zur parenteralen Übertragung schon kleinste Mengen Blut (0,005 ml) genügen, wird inzwischen auch die Möglichkeit der Infektion durch Mundwerkzeuge von Insekten, z.B. Stechmücken, Bremsen, Flöhe usw., in Betracht gezogen (14, 54). Ob auch andere Tiere, insbesondere unsere Haustiere, mit dem Virus der Serumhepatitis infiziert sind und damit die Krankheit übertragen können, ist noch nicht geklärt. Bereits 1967 schreibt HENNEBERG: "Es gibt keine Beweise, daß die Hepatitis eine Zoonose ist, doch müßten alle Haustiere in dieser Hinsicht geprüft werden" (31). Bei der Assoziation des HAA mit dem infektiösen Agens der Serumhepatitis gewinnt auch die Forderung BLUMBERG's und Mitarb. von 1968 an Bedeutung, die in folgender Bemerkung enthalten ist: "Da wir Grund zur Annahme haben, daß das Australia-Antigen mit einer chronischen Infektion assoziiert ist, wird es notwendig sein, Tiere über einen längeren Zeitraum zu beobachten."

Das HAA wird auf diese Weise zum Indikator-Antigen nicht nur für die bereits erfolgten Infektionen mit dem Virus der Serumhepatitis. Es fördert durch die Möglichkeit seines Nachweises im infizierten Milieu und in dort lebenden Tieren geeignete Maßnahmen für Desinfektion und Prophylaxe (27).

2.6. Australia-Antigen und Leberenzyme

Um den Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Australia-Antigens und dem Grad der Leberschädigung zu klären, wurden parallel zur Untersuchung auf HAA die Leberenzymwerte festgestellt. Sowohl für die Diagnose der Hepatitis als auch für die Verlaufkontrolle stellt die Bestimmung der Serumenzymaktivitäten eine wertvolle Methode dar (17, 19, 24, 55). Sie ist ein zuverlässiger Indikator für Anstieg und Rückgang krankhafter Veränderungen in der Leber. Eine besondere Rolle spielt hierbei die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (SGPT), da dieses Enzym ausschließlich in der Leber vorkommt. Im Rahmen umfangreicher Untersuchungen wurde von DUDLEY und Mitarb. (24) sowie von KAPP und KUWERT (36) festgestellt, daß die Aktivität der Serumtransaminasen in umgekehrter Beziehung zum HAA-Titer steht. Bei stark erhöhten SGPT-Werten kann in der Regel Australia-Antigen nicht nachgewiesen werden, während bei positivem HAA-Nachweis keine Erhöhung der Serumtransaminasen festzustellen ist. Dieses Ergebnis bestätigt auch die Aussage von BLUMBERG und Mitarb. (17), die feststellten, daß das Australia-Antigen i.d.R. nur zu Beginn einer Hepatitis im Serum nachgewiesen werden kann. Der Nachweis des Australia-Antigens erfolgt nur im Stadium der Virämie. Zu diesem Zeitpunkt ist noch keine Leberschädigung eingetreten, d.h., auch die Serumtransaminasen sind nicht erhöht. Nach der Organmanifestation in der Leber steigen die Serumtransaminasen oft sehr stark an, das Australia-Antigen ist jedoch aus dem Blut verschwunden. Allerdings wäre es möglich, daß das Australia-Antigen in den Faeces sehr viel länger nachweisbar bleibt als im Blut (78, 79). Außer

im Stuhl wurde das Australia-Antigen inzwischen auch in anderen Ausscheidungen wie Magensaft, Galle und Menstruationsblut nachgewiesen (7, 15, 53, 68, 69).

2.7. Nachweismethoden

Seit der Entdeckung des Australia-Antigens und seinem Zusammenhang mit der Virushepatitis bemühen sich Forscher in aller Welt um die Entwicklung von möglichst sensiblen Nachweismethoden. ALLISON und BLUMBERG (2) verwendeten die Immundiffusion (Agar-Gel-Diffusion) nach OUCHTERLONY. Dieser Test beruht auf dem Prinzip der Präzipitation eines Antigen-Antikörper-Systems in halbfesten Medien, wie z.B. Agar. Mit diesem Test ist aber lediglich eine qualitative Analyse möglich. Jedoch ist die Methode noch immer sehr gebräuchlich, da der Verbrauch an Serum bzw. Antiserum sehr gering ist. Ein Nachteil der Methode ist u.U., daß das Ergebnis erst nach ein bis zwei Tagen abgelesen werden kann (1, 38, 70, 71, 72, 83).

Gute Ergebnisse in wesentlich kürzerer Zeit liefert die Mikro-Überwanderungselektrophorese (Gegenstromelektrophorese) bzw. die Immunoelktrophorese. Präzipitierende Antigene und Antikörper treffen hier nicht nur durch einfache Diffusion, sondern durch ihre Wanderung im elektrischen Feld aufeinander. Die Ergebnisse können nach zwei bis drei Stunden abgelesen werden. Die Methode soll außerdem nach Meinung vieler Autoren empfindlicher sein als die Agar-Gel-Diffusion (1, 14, 30, 47, 57, 62, 71).

Als empfindlichste, wenn auch sehr aufwendige Methode gilt die Komplementbindungsreaktion (KBR). Hier bietet sich vor allem die Möglichkeit einer qualitativen und quantitativen Analyse. Das Antigen wird hier gegen einen standardisierten Antikörper titriert bzw. umgekehrt und durch ein zweites System, das als Indikator dient, wird die Reaktion sichtbar gemacht. Diese Methode hat außerdem den Vorteil, daß das

Australia-Antigen auch bei solchen Patienten erfaßt wird, bei denen ein Antigen-Antikörper-Komplex im Serum vorliegt, was in bestimmten Stadien der Serumhepatitis häufig der Fall ist. Der Test dauert ebenfalls nur wenige Stunden (1, 64, 70, 71, 73).

Eine neuere Methode zum Nachweis des Australia-Antigens ist die Methode des Radioimmunotests. Dabei wird eine Standard-Antikörper-Lösung mit radioaktivem Jod¹²⁵ markiert und mit dem zu testenden Serum in Verbindung gebracht. Wenn das Testserum Australia-Antigen enthält, ändert sich die Radioaktivität durch Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes. Diese Veränderung wird mit der Radioaktivität einer Australia-Antigen-freien Probe verglichen. Mit dieser Methode ist es möglich, auch sehr niedrige Australia-Antigen-Titer zu erfassen. Sie ist somit genauer als herkömmliche Nachweismethoden. Ihr Nachteil ist der große technische Aufwand, der meist nur in Speziallaboratorien möglich ist (65, 81).

Kürzlich wurde für den Nachweis des Anti-Australia-Antigens ein Hämagglutinationstest entwickelt, bei dem Erythrozyten mit Australia-Antigen sensibilisiert werden. Sie agglutinieren dann mit dem spezifischen Antikörper. Es handelt sich um eine äußerst empfindliche Nachweismethode, deren Genauigkeit das 2.000fache der Immundiffusion beträgt (14, 28, 80).

Eine neuere Nachweismethode ist die Immunofluoreszenz. Mit Hilfe dieser Methode konnte das Australia-Antigen in Leberzellkernen von Patienten, deren Serum HAA-positiv war, nachgewiesen werden (14, 50).

Zur sehr schnellen Testung von Seren auf Australia-Antigen wurde auch ein Latex-Test entwickelt. Hierbei werden Latexpartikel mit einer Gammaglobulinfraktion beladen, die spezifische Antikörper gegen das Australia-Antigen enthält. Auch dieser Test ist eine Modifizierung der Agglutination von Antigen-Antikörper-Komplexen. Die Genauigkeit dieses Tests entspricht nach Angaben mehrerer Autoren der der Gegenstrom-elektrophorese (13, 18, 43).

KLEY (39) machte jedoch darauf aufmerksam, daß die Empfindlichkeit dieser Reaktion nur auf Kosten einer erhöhten Unspezifität zu erreichen sei. Bei Überprüfung des Latexfixationstests durch die Verfasserin an drei klinischen Fällen (zweimal Hepatitis, einmal Leberzirrhose) ergab sich im Widerspruch zur parallel geführten Überwanderungselektrophorese ein positives Resultat. Da Verdacht bestand, daß eine medikamentöse Vorbehandlung der Patienten das Ergebnis beeinflußt hatte, wurden über 124 in Kliniken verwandte Medikamente getestet, die zu einem großen Teil noch in Verdünnungen positive Reaktionen zeigten. Damit ist die Verwertung des Latextestes während des klinischen Verlaufs einer durch Medikamente beeinflussten Serumhepatitis infrage gestellt.

Der Nachweis von Australia-Antigen im menschlichen Serum wird inzwischen in bezug auf die Infektion mit Hepatitis-B-Viren differenzierter bewertet. Neue Erkenntnisse (59) weisen nach, daß es sich dabei um verschieden zusammengesetzte Hepatitis-B-Antigen-Immunokomplexe handelt mit epidemiologisch unterschiedlich reagierenden Subdeterminanten, die den Organismus nach Kontakt mit Hepatitis-B-Antigen-positivem Material zu verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten herausfordern.

Auch bei der Suche nach den Infektionsquellen ist man heute auf Vermutungen angewiesen. Insbesondere scheint die Frage interessant, inwieweit Tiere als Träger und Ausscheider infrage kommen und bei der Übertragung der Virushepatitis - sei es direkt oder indirekt über ihre Produkte oder die aus ihnen hergestellten Lebensmittel - eine Rolle spielen können (21, 27). Bei der immunologischen Testung von Tierseren auf Reaktionen mit von Menschen gewonnenem HAA muß jedoch mit der Bildung von zusätzlichen spezifischen Antikörpern gegen Immunglobuline aus Tierserum gerechnet werden. Falsch-positive Resultate sind deshalb nicht auszuschließen.

ALTER und Mitautoren (4) konnten nachweisen, daß bovines Thrombin als Zusatz zum Serum von Hepatitis-Test-Reagenten

mit den Antikörpern von normalen Spendern reagierte. Ähnliche falsch-positive Reaktionen auf HAA kamen in 0,19 % bei 15.632 Blutspendern vor, wenn aus Wiederkäuer-Serum gewonnenes Anti-HAA verwendet wurde.

3. Hepatitis-A-Antigen

Von einigen Autoren (59) wurde zwar auch ein EHA - mit der "epidemischen Hepatitis-Assoziiertes-Antigen" - beschrieben, jedoch durch Nachweis mit einem Antikörper, der auch mit dem HAA reagierte. Es gibt auch keine Hinweise, daß dieses Antigen speziell bei der epidemischen Hepatitis vorkommt. Neuerdings wird von PROVOST (63) ein spezifisches Hepatitis-A-Virus beschrieben, das bisher nach der Krankenkarteinummer des Patienten, aus dessen Blut es gewonnen wurde, nur "CR 326" genannt wird und bisher nicht klassifiziert ist. Es wird angenommen, daß es sich um ein RNS-Virus (48) handeln könnte. In Zusammenhang mit diesem CR 326-Stamm wurde sogar schon von der Entwicklung einer Vaccine gegen die Hepatitis gesprochen, da dieser Stamm erfolgreich auf die niedriger stehenden Kralenaffen (*saguinus mystax*) übertragen werden konnte. Bei den Affen konnte sowohl eine aktive als auch eine passive Immunität erzielt werden. Das CR 326-Partikel ist 25 bis 40 nm groß, hitze- und ätherstabil.

FEINSTONE und Mitarb. (25, 26) berichten über ein Hepatitis-A-Antigen, das von den Autoren selbst als "virus like" bezeichnet wird.

Eigene Untersuchungen

1. Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Untersucht wurden 350 Seren von Schlachtrindern vom Städtischen Schlachthof in München¹⁾. 190 Seren wurden bei der Schlachtung von gesunden, d.h. bei der Lebendbeschau nicht beanstandeten Tieren gewonnen, während 160 Seren aus dem Sanitätsschlachthaus des Münchener Schlachthofs stammten. Das Blut wurde während des Schlachtvorgangs aus der angeschnittenen Jugularvene entnommen (ca. 100 ml/Tier). Durch zehnmütiges Zentrifugieren bei 2.000 U/min²⁾ wurde das für die anschließend durchgeführten Untersuchungen benötigte Serum gewonnen.

Gleichzeitig wurde aus den korrespondierenden Lebern ein ca. 1 - 3 cm³ großes Stück aus dem Bereich der Leberpforte herausgeschnitten und für die spätere histologische Untersuchung in einer 7 %-igen Formaldehyd-Lösung aufbewahrt. Die histo-pathologischen Untersuchungen der Leberproben wurden im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Tierärztlichen Fakultät München³⁾ durchgeführt.

2. Methodik

2.1. Makroskopische Leberuntersuchung

Die makroskopische Untersuchung der Lebern erfolgte im Rahmen der Fleischbeschau. Die Lebern wurden hinsichtlich Aussehen, Farbe und Konsistenz des Gewebes geprüft. Die im Fleischbeschaugesetz (AB.A §§ 20 (2); 21 (1) Nr. 6; 22) vorgeschriebenen Leberschnitte wurden durchgeführt und da-

1) Den Herren Städt. Veterinärdirektoren Dr. Strobl und Dr. Schneidawind sei an dieser Stelle für ihre bereitwillige Unterstützung der Arbeit herzlich gedankt.

2) Zentrifuge Typ UJ 1, Fa. Wagner und Munz, München

3) An dieser Stelle möchte ich Herrn Dr. B. Schlotke für die Anfertigung und Durchsicht der histologischen Präparate herzlich danken.

bei auf Leberegelbefall geachtet. In den Fällen einer Beanstandung der Leber wurden die jeweiligen Gründe der Beanstandung notiert.

2.2. Histologische Leberuntersuchung

Von allen untersuchten Tieren wurden sofort nach Ausschachtung der Baueingeweide Leberproben für die histologische Untersuchung entnommen. Zu diesem Zweck eignete sich am besten ein ca. 1 - 3 cm³ großes Stück, möglichst aus dem Parenchym des Processus papillaris des Lobus caudatus im Bereich der Leberpforte, das unmittelbar an Ort und Stelle in 7 %-igem Formol fixiert wurde. Vereinzelt traten Ausfälle durch nicht ausreichende Fixierung oder Mazeration bei unregelmäßig geschnittenen Stücken von schon makroskopisch als brüchig erkannten Organen auf.

Die weitere Bearbeitung erfolgte im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie.

Die aus den Leberproben hergestellten Paraffin-Schnitte wurden mit Hämalaun-Eosin gefärbt. Bei Verdacht (in drei Fällen) auf degenerative Veränderungen erfolgte eine Weiterdifferenzierung mit Hilfe der Fett-Rot-Hämalaun- und der Masson'schen Trichromfärbung.

2.3. Untersuchung der Leberenzymaktivitäten

In den letzten Jahren wurde zusätzlich zur Möglichkeit einer Leberuntersuchung auf bioptischem Wege eine große Zahl von Laboratoriumsmethoden entwickelt mit dem Ziel, die am Patienten gestellte Verdachtsdiagnose auf Erkrankung der Leber wissenschaftlich exakt abzusichern. Viele dieser Labormethoden waren aber nur mit Vorbehalt anzuwenden, da sie zu wenig leberspezifisch waren, so z.B. alle Prüfmethoden des Eiweißstoffwechsels, der zwar im wesentlichen in

der Leber stattfindet, der aber insbesondere in Fällen von akuten Lebererkrankungen anfänglich in keiner Weise gestört sein muß. Erst durch die Entwicklung der Enzymdiagnostik (Nachweis von zelleigenen Enzymen im extrazellulären Raum, also auch im Serum) ist es gelungen, mit einer relativ beschränkten Anzahl von leicht, d.h. in praxi durchführbaren serologischen Bestimmungsmethoden eine zuverlässige Leberfunktionsdiagnostik zu betreiben. Obwohl auch diese Enzyme nicht alle organspezifisch sind, läßt sich aus dem Verhältnis bestimmter Enzyme im Blut eine so genaue Diagnose stellen, daß BRÜHL im Falle der bei der Leberdiagnostik wesentlichen Transaminasen von "Seismographen der Leberfunktion" spricht (19). So ist schon bei der Schädigung weniger Leberzellen ein charakteristischer Enzymanstieg im Blut nachzuweisen. Die Sensibilität des Enzymanstiegs ist so groß, daß an der Veränderung der Werte der jeweilige aktuelle Zustand der Leber und somit auch der Krankheitsverlauf abgelesen werden kann. Eine geringe Enzymaktivität im Normalserum ist Ausdruck des normalen Zerfalls und Wiederaufbaus von Zellen. Außerdem kann aus der unterschiedlichen Lokalisation der Enzyme im intrazellulären Raum auf den Grad der Schädigung der Zelle rückgeschlossen werden. So befinden sich die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und die Laktatdehydrogenase (LDH) ausschließlich im Zytoplasma, während die Glutamat-Oxalazetat-Transaminase (GOT) dort zur Hälfte, zur anderen Hälfte aber in den Mitochondrien gelagert ist. Nur in diesen befindet sich die Glutamat-Laktat-Dehydrogenase (GLDH). Bei einer geringen Schädigung der Leberzelle ist hauptsächlich ein GPT-Anstieg im Serum zu finden, während bei einer schweren Schädigung mit Zerstörung der Mitochondrien die GLDH sowie die GOT neben der GPT stark erhöht ist. Durch die Bestimmung der Enzymaktivitäten lassen sich somit bereits Schäden erkennen, die sich einer mikroskopischen Untersuchung noch entziehen; dies insbesondere in Fällen mit akuter Hepatitis, die im Anfangsstadium ohne Parenchymschädigung verläuft, bei der aber bereits eine Verschiebung des Enzymverhältnisses nach $SGPT > SGOT$ nachweisbar ist. U.U. ist diese diagnostische Möglichkeit für

den Nachweis der akuten Hepatitis von ausschlaggebender Bedeutung, wenn sich anhand des klinischen Bildes (anakterische Verlaufsform) die Verdachtsdiagnose nur schwer stellen läßt. Für die Diagnostik von Lebererkrankungen sind hauptsächlich die Transaminasen GOT und GPT und die Dehydrogenase GLDH von Bedeutung. Die Hauptaufgabe der Transaminasen liegt in der Aminosäuresynthese. Sie übertragen Aminogruppen auf das stickstofffreie Kohlenstoffgerüst einer Fettsäure. Dadurch ist der Organismus in der Lage, nichtessentielle Aminosäuren zu synthetisieren. Diese Synthese findet hauptsächlich in der Leber statt, aber auch in anderen Organen (Herz) und in der Skelettmuskulatur. Deshalb ist im Normalserum bereits eine gewisse Enzymaktivität nachzuweisen, das Verhältnis von SGPT : SGOT ist normalerweise 1,3. Die Aussagekraft eines Anstiegs der Transaminasenaktivität läßt sich aber durch Hinzuziehung des Wertes der GLDH noch wesentlich steigern. So ist für die Leberdiagnostik der Quotient aus $(SGOT + SGPT) : GLDH$ von größter Bedeutung. Normalerweise liegt er zwischen 20 und 30. Eine Erhöhung auf über 50 zeigt eindeutig eine akute Hepatitis an, während bei einem Verschußikterus der Wert auf 5 - 15 fällt. Chronische Hepatitiden zeigen meist Werte von 30 - 40.

Analoge Versuche zur Anwendbarkeit der Enzymdiagnostik auch in der Veterinärmedizin zeigten, daß entsprechende Verhältnisse nicht nur bei Primaten und Halbaffen (63), sondern auch bei den übrigen Haussäugetieren (40, 67) vorliegen. Durch eine internationale Vereinbarung konnten die früher gebräuchlichen Meßgrößen durch eine einzige Maßeinheit der Enzymaktivität, die Milli-Units pro ml (mU/ml), abgelöst werden. Die Einheit U eines jeden Enzyms stellt die Menge dar, welche unter Standardbedingungen 1 Mikromol Substrat in einer Minute katalytisch umwandelt.

Prinzip der Enzymbestimmung:

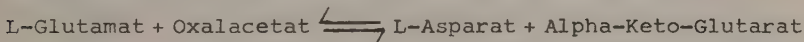
Unter Berücksichtigung des jeweiligen pH- und Temperatur-optimums setzt man einer bestimmten Menge des zu untersu-

chenden Serums das Substrat (das ist die vom Enzym aktivierte Verbindung) des zu untersuchenden Enzyms im Überschuß zu. Dann wird die Probe eine bestimmte Zeit bei konstanter Temperatur (25 oder 37° C) inkubiert. Schließlich bestimmt man die während der Inkubation erfolgte Abnahme des Substrats oder die Zunahme eines Umwandlungsprodukts. Daraus erfolgt dann die Berechnung der Enzymaktivität. Dabei gilt: Die Enzymkonzentration ist proportional zu der pro Zeiteinheit umgesetzten Substratmenge (mU/min).

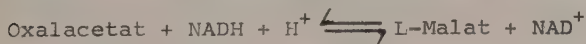
Die nachfolgenden Untersuchungen wurden jeweils mit dem MONOTEST für SGOT, SGPT und GLDH durchgeführt¹⁾. Die Werte wurden an einem Photometer nach ZEISS²⁾ bei einer Wellenlänge von Hg 366 nm gegen verdünnte Pikrinsäure (1 Tropfen auf 100 ml destilliertes Wasser) gemessen.

2.31 Bestimmung der SGOT

Das Enzym SGOT (Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase) katalysiert die Gleichgewichtsreaktion



Die Aktivität der SGOT wird indirekt bestimmt über die durch diese Reaktion hervorgerufene Zunahme der Oxalessigsäure. Die Oxalessigsäure wird jedoch nicht direkt gemessen, sondern als Meßgröße dient NADH (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid), das über die Reaktion entsteht



Der Verbrauch an NADH durch die gebildete Oxalessigsäure wird durch Abnahme der Extinktion gemessen.

1) SGOT-MONOTEST^R 10; Best.-Nr. 15874, 4 x 10 Bestimmungen
SGPT-MONOTEST^R 10; Best.-Nr. 15875, 4 x 10 Bestimmungen
GLDH-MONOTEST^R ; Best.-Nr. 15883, 19 Bestimmungen
Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, Mannheim

2) ZEISS-Spektral-Photometer PMQ II

Eigener Untersuchungsgang:

Der SGOT-MONOTEST wird mit destilliertem Wasser gelöst und die Lösung bei einer konstanten Temperatur von 25° C gehalten. In eine Küvette von 1 cm Schichtdicke werden 3 ml dieser Lösung pipettiert, dazu kommen 0,5 ml des zu untersuchenden Rinderserums. Die Küvette wird mit einem Glasdeckel verschlossen und der Inhalt vorsichtig gemischt. Danach erfolgt sofort die Messung der Extinktion. Die Messungen werden nach 1, 2, 3, 4 und 5 Minuten wiederholt. Aus den Extinktionsdifferenzen pro Minuten ($\Delta E/\text{min}$) wird der Mittelwert gebildet. Mit Hilfe dieses Wertes kann die Aktivität der SGOT im Serum berechnet werden. Dabei gilt:

$$A \text{ (mU/ml)} = \frac{1000 \times V}{\text{min} \times \epsilon \times d \times v} \times \Delta E$$

A = Enzymaktivität

V = Summe der im Schema angegebenen Volumina (= 3,5 ml)

v = Volumen des eingesetzten Serums (= 0,5 ml)

min = Abstand der Ablesungen (= 1 min)

ϵ = Extinktionskoeffizient von NADH; dieser Wert ist abhängig von der Wellenlänge und beträgt bei Hg 366 nm 3,3 cm²/μMol

d = Schichtdicke der Küvette (= 1 cm)

ΔE = durchschnittliche Extinktionsdifferenz

Dabei ergibt sich bei unveränderten V-, min-, ϵ -, d- und v-Werten:

$$A \text{ (mU/ml)} = \frac{1000 \times 3,5}{1 \times 3,3 \times 1 \times 0,5} \times \Delta E$$

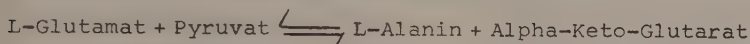
$$A \text{ (mU/ml)} = \frac{1000 \times 7}{3,3} \times \Delta E$$

$$A \text{ (mU/ml)} = 2.121 \times \Delta E$$

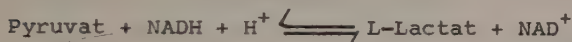
Der Normalwert für die SGOT beim Rind liegt zwischen 10 - 50 mU/ml.

2.32 Bestimmung der SGPT

Das Enzym SGPT (Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase) katalysiert die Gleichgewichtsreaktion



Auch hier wird die Enzymaktivität indirekt bestimmt über die Zunahme an Pyruvat. Die Meßgröße ist wie bei der Bestimmung der SGOT ebenfalls NADH, die durch das entstehende Pyruvat nach folgender Gleichung umgesetzt wird:



Der Verbrauch an NADH wird durch die Abnahme der Extinktion gemessen.

Eigener Untersuchungsgang:

3 ml des mit destilliertem Wasser aufgelösten SGPT-MONO-TEST werden in eine Küvette mit 1 cm Schichtdicke gebracht. Dazu werden 0,5 ml Rinderserum pipettiert. Die Küvette wird mit einem Glasdeckel verschlossen und der Inhalt wird vorsichtig gemischt. Danach erfolgt sofort die Messung der Extinktion. Diese Messung wird 5 min lang nach je einer Minute wiederholt. Aus den Extinktionsdifferenzen pro Minute ($\Delta E/\text{min}$) wird der Mittelwert gebildet. Aus diesem Mittelwert wird die Aktivität der SGPT nach folgender Formel berechnet:

$$A \text{ (mU/ml)} = \frac{1000 \times V}{\text{min} \times x \times d \times v} \times \Delta E$$

A = Enzymaktivität in mU/ml

V = Summe der im Schema angegebenen Volumina (= 3,5 ml)

v = Volumen des eingesetzten Serums (= 0,5 ml)

ε = Extinktionskoeffizient von NADH (bei Hg 366 nm = 3,3)

d = Schichtdicke der Küvette (= 1 cm)

min = Zeitabstand zwischen den Ablesungen der Extinktion (= 1 min)

ΔE = Extinktionsdifferenz im Durchschnitt

Da ΔE die einzige veränderliche Größe ist, ergibt sich daraus

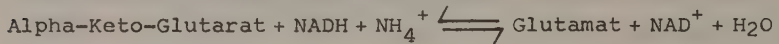
$$A \text{ (mU/ml)} = \frac{1000 \times 3,5}{1 \times 3,3 \times 1 \times 0,5} \times \Delta E$$

$$A \text{ (mU/ml)} = 2.121 \times \Delta E$$

Die Normalwerte beim Rind betragen 6 - 13 mU/ml.

2.33 Messung der GLDH

Die GLDH (Glutamat-Lactat-Dehydrogenase) katalysiert die wasserstoffübertragende Reaktion



Die Aktivität der GLDH wird bestimmt durch die Geschwindigkeit der durch diese Reaktion hervorgerufenen NADH-Abnahme.

Eigener Untersuchungsgang:

Das Substrat des GLDH-MONOTESTs (Ammoniumacetat + Alpha-Ketoglutarat) wird mit 2 ml Triäthanolamin-Puffer (pH 8,0) aufgelöst. Zu dieser Lösung wird 1 ml Rinderserum pipettiert und mit der Lösung vorsichtig gemischt und 5 min lang bei einer konstanten Temperatur von 25° C stehengelassen. Nach genau 5 min wird die erste Extinktionsmessung vorgenommen (E_1). Nach weiteren 5 min (25° C im Küvetten-thermostat) erfolgt die zweite Messung (E_2).

Danach werden 0,1 ml NADH zu der Lösung pipettiert und wieder vorsichtig gemischt. Es erfolgt sofort die dritte Extinktionsablesung (E_3). Die letzte Ablesung erfolgt nach weiteren 5 min (25° C im Küvetten-thermostat) (E_4). Die Extinktionsdifferenz ΔE ist

$$\Delta E = (E_3 - E_4) - (E_1 - E_2)$$

Die Berechnung der GLDH-Aktivität erfolgt nach der Gleichung

$$A \text{ (mU/ml)} = \frac{1000 \times V}{\text{min} \times \epsilon \times d \times v} \times \Delta E$$

- A = Enzymaktivität
V = Summe der angegebenen Volumina (= 3,1 ml)
v = Volumen des eingesetzten Serums (= 1 ml)
d = Schichtdicke der Küvette (= 1cm)
min = Reaktionszeit (= 5 min)
 ϵ = Extinktionskoeffizient von NADH (bei Hg 366 nm = 3,3)

Da ΔE die einzige veränderliche Größe ist, ergibt sich daraus

$$A \text{ (mU/ml)} = \frac{1000 \times 3,1}{5 \times 3,3 \times 1 \times 1} \times \Delta E$$

$$A \text{ (mU/ml)} = 188 \times \Delta E$$

Der Normalwert für GLDH im Rinderserum beträgt 1 - 3 mU/ml.

2.4. Agar-Gel-Diffusions-Test

Zum Nachweis des Australia-Antigens eignet sich die Immunpräzipitation im halbfesten Medium Agar bzw. Agarose. Das lösliche Antigen verbindet sich mit dem entsprechenden Antikörper zu einem unlöslichen Antigen-Antikörper-Komplex, der als "Präzipitationslinie" ausfällt.

Um Antigen und Antikörper gleichzeitig nachweisen zu können, wurde die Methode der sog. "Doppeldiffusion" angewendet.

Reagentien:

Agar purum Behring¹⁾: Mischung aus hochmolekularen Kohlehydraten, die aus Rotalgen gewonnen werden. Die wesentlichen Bestandteile sind D- und L-Galactose sowie esterartig gebundene Schwefelsäure.

Agarose Behring²⁾: Agarose ist Agar-Agar, bei dem der Agaropectinbestandteil abgetrennt wurde. Sie hat einen hohen Gelierwert und enthält keine ionisierbaren Gruppen.

1) Agar purum; Behringwerke AG, Marburg/Lahn

2) Agarose; Behringwerke AG, Marburg/Lahn

Diäthyl-Barbiturat-Acetat-Puffer pH 8,2:

13,38 g Natrium-Diäthylbarbiturat

8,83 g Natriumacetat reinst krist.

180 ml 0,1 N Salzsäure

Aqua dest. ad 1,5 l

Der pH-Wert von 8,2 wird durch Zugabe einiger Tropfen 0,1 N HCl oder 0,1 N NaOH mit Hilfe eines pH-Meters¹⁾ genau eingestellt.

Anti-Au-SH-Serum präzipitierend Behring²⁾:

Es wird als hochgereinigtes, von menschlichem Protein befreites Serum durch Immunisierung von Kaninchen mit Australia-Antigen gewonnen und enthält präzipitierende Antikörper gegen das Australia-Antigen. Auf Kontrollen, ob in diesem Serum simultan auch noch isopräzipitierende Antikörper gegen Rinderglobulin enthalten sein könnten, wurde auf Grund der von ALTER und Mitarb. (4) mitgeteilten Reagentenzahlen von 0,19 % unter 15.632 Blutspendern bewußt verzichtet.

Au-SH-Kontrollserum positiv Behring³⁾:

Es handelt sich um ein lyophilisiertes Humanserum, das Australia-Antigen enthält. Es wird vor Gebrauch mit destilliertem Wasser aufgelöst.

Herstellung eines 1 %-igen Agars:

1 g Agar purum Behring wird in einer Mischung aus 50 ml Diäthyl-Barbiturat-Puffer mit dem pH-Wert 8,2 und 50 ml destilliertem Wasser gelöst und im Wasserbad so lange erhitzt, bis die Lösung klar ist.

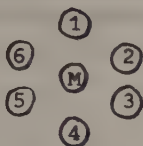
Von der heißen Lösung werden sofort jeweils 20 ml in fettfreie, völlig waagrecht liegende Petrischalen pipettiert. Nach Erstarren des Agars werden die Petrischalen verschlossen und bis zur Weiterverwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

1) pH-Meter; Fa. L. Pusl, München

2) Anti-Au-SH-Serum präzipitierend; Behringwerke AG, Marburg/Lahn

3) Au-SH-Kontrollserum positiv; Behringwerke AG, Marburg/Lahn

Zur Durchführung des Tests werden mit einer Metallstanze¹⁾ mit Hilfe eines Schemas je 3 Rosetten mit einem Löcherabstand von 5 mm in jede Petrischale gestanzt. Jede Rosette besteht aus 7 Löchern, die nach folgendem Schema angeordnet sind:



Die Löcher der Rosette werden nun mit Hilfe von Pasteur-Einmalpipetten²⁾ in der folgenden Reihenfolge randvoll gefüllt:

In das mittlere Loch (M) wird Anti-Au-SH-Serum pipettiert, die Löcher 1 und 4 werden jeweils mit der positiven Antigen-Kontrolle gefüllt. In die Löcher 2 und 3 bzw. 5 und 6 wird jeweils ein zu testendes Rinderserum gefüllt. Danach werden die Petrischalen wieder verschlossen und im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Nach 24 - 48 Stunden kann das Ergebnis abgelesen werden. Die Dauer der Inkubationszeit ist im wesentlichen abhängig von Art und Konzentration des Agars. In Parallelversuchen mit verschiedenen Agar- und Agarosekonzentrationen konnte festgestellt werden, daß für diesen Test 0,8 %-ige Agarose am besten geeignet ist. Die Präzipitationslinien konnten bei Verwendung von 0,8 %-iger Agarose schon nach 24 Stunden deutlich abgelesen werden, während sie bei Verwendung von 1 %-igem Agar sowie auch von 0,8 %-igem Agar erst nach 48 - 72 Stunden deutlich sichtbar waren. Längeres Stehenlassen im Brutschrank veränderte die Ergebnisse nicht, auch die Deutlichkeit der Präzipitationslinien nahm bei längerer Inkubation nicht zu. Abgesehen von der Dauer der Inkubationszeit wurden bei Verwendung von Agar und Agarose durchweg gleiche Ergebnisse erzielt.

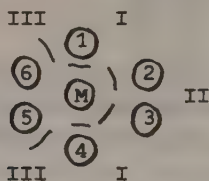
Es konnten drei verschiedene Präzipitationslinien beobachtet werden:

Zwischen den Löchern M und 1 bzw. M und 4 tritt immer eine

1) Metallstanze aus V2A-Stahl; Fa. Vogl, Stuttgart

2) Pasteur Capillary Pipettes, 230 ~~mm~~ μ m; Fa. Bachhofer, Degerschlacht

Präzipitationslinie (I) auf. Hier treffen das bekannte Antigen und der Antikörper aufeinander. Eine Präzipitationslinie (II) zwischen den Löchern M und 2/3 bzw. M und 5/6 zeigt das Vorhandensein von Antigen im Testserum an. Eine Präzipitationslinie (III) zwischen den Löchern 1 oder 4 und 2/3 bzw. 5/6 würde für das Vorkommen von Antikörpern im Testserum sprechen.



Alle Testseren wurden unverdünnt verwendet.

2.5. Latex-Agglutinations-Test

Zur schnellen Vortestung der Seren auf das Australia-Antigen wurde die Latex-Agglutination¹⁾ durchgeführt.

Reagentien:

Latex-HAA-Reagenz: eine wässrige Suspension von Polystyrol-Latex-Partikeln, die mit Kaninchen-Gamma-Globulin, das spezifische Antikörper gegen das Australia-Antigen enthält, beladen sind.

HAA-Kontrollserum positiv: ein flüssiges Humanserum, das Australia-Antigen enthält.

HAA-Kontrollserum negativ: ein verdünntes Humanserum ohne Australia-Antigen.

Eigener Untersuchungsgang:

Auf eine Testplatte aus schwarzem Glas, die in sechs Quadrate eingeteilt ist, werden in vier Quadrate je ein Tropfen eines zu untersuchenden Serums und ein gleich großer

1) Latex-HAA-Agglutinationstest; Behringwerke AG, Marburg/Lahn

Tropfen des Latex-HAA-Reagenz gegeben. Statt des Rinderse-
rums wird auf den beiden übrigen Quadraten das positive
bzw. negative Kontrollserum verwendet. Die beiden Tropfen
- das Serum und das Reagenz - werden mit einem Glasrühr-
stäbchen gut vermischt und danach die Testplatte 5 min lang
rotierend bewegt. Nach 5 min zeigen HAA-positive Seren eben-
so wie das positive Kontrollserum eine deutliche Agglutina-
tion.

Um falsch-positive oder -negative Resultate möglichst aus-
zuschließen, wurden in allen Untersuchungsgängen von allen
Seren Doppelbestimmungen durchgeführt. Außerdem wurde ein
Teil der Testseren den wie folgt beschriebenen verschiede-
nen Behandlungen unterzogen und der Test mit diesen vorbe-
handelten Seren jeweils wiederholt.

- a) Es wurden von 20 im ersten Untersuchungsgang positiv
reagierenden Seren Verdünnungsreihen mit physiologi-
scher Kochsalzlösung hergestellt (1:2, 1:4, 1:8, 1:16)
und die Latex-Agglutination mit diesen Verdünnungen wie-
derholt.
- b) Jeweils 1 ml des unverdünnten Serums der gleichen Pro-
ben wurde im Wasserbad eine halbe Stunde auf 56° C er-
hitzt. Nach Abkühlen der Seren wurde der Latex-Test wie-
derholt.
- c) Jeweils 1 - 2 ml des unverdünnten und nicht erhitzten
Serums wurden mit Porengröße 0,02 μ durchgefiltert¹⁾.
Mit den gefilterten Seren wurde der Latex-Test eben-
falls wiederholt.

1) Sartorius-Membranfilter Format 25; Fa. Sartorius, Göt-
tingen

Tabelle 1: Verhalten von 20 im ersten Untersuchungsgang des Latex-HAA-Tests positiv reagierenden Seren nach unterschiedlicher Vorbehandlung.
(Als zweifelhaft wurden Reaktionen gekennzeichnet mit undeutlichen - ungleich großen bzw. unscharf konturierten - Verklumpungspartikeln nach Überprüfung des Agglutinats in Lupenvergrößerung.)

Behandlungsart	positiv	zweifelhaft	negativ
unverdünnt	20 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
verdünnt 1:2	19 (95%)	1 (5%)	0 (0%)
1:4	18 (90%)	1 (5%)	1 (5%)
1:8	14 (70%)	4 (20%)	2 (10%)
1:16	9 (45%)	4 (20%)	7 (35%)
erhitzt (56°C/30min)	18 (90%)	2 (10%)	0 (0%)
filtriert (0,02 µ)	20 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

Deutliche Abweichungen der Ergebnisse wurden durch die angeführten Behandlungsmethoden nicht erzielt. Die mit der Verdünnung 1:8 auftretenden Zunahmen an zweifelhaften und negativen Agglutinationen sprechen noch nicht für das Vorhandensein von Störfaktoren, die damit eine Verwendung des Latex-Tests als Screeningverfahren infrage stellen. Dagegen sprechen auch die Resultate der Agglutination nach Filtration und Erhitzung der Seren.

E r g e b n i s s e

Die in den nachstehenden Tabellen aufgeführten Ergebnisse beziehen sich, wenn nicht anders gekennzeichnet, auf 350 untersuchte Schlachtrinder, von denen 190 aus Normalschlachtungen des Schlachthofs München stammen; 160 Proben stammen aus der Sanität desselben Schlachthofs. Die Entnahme der Proben erfolgte stichprobenartig.

Tabelle 2: Makroskopischer Leberbefund im Vergleich mit den Ergebnissen des Latex-Agglutinations-Tests

	Sanität (160 = 100 %)		Normalschlachtung (190 = 100 %)	
	positiv	negativ	positiv	negativ
Latex-Befund:	16(10%)	144(90%)	24(13%)	166(87%)

davon zeigten:

Distomatose	2(14%)	13(9%)	3(13%)	2(1%)
Leberschwellung	4(25%)	38(27%)	2(8%)	3(2%)
Leberdegeneration	3(19%)	16(11%)	0(0%)	1(0,5%)
keinen Befund	7(42%)	77(53%)	19(79%)	160(96,5%)

Die makroskopisch erkennbaren Leberveränderungen entsprechen den Befunden bei der Fleischbeschau. Als "Leberschwellung" wird eine deutlich wahrnehmbare Umfangsvermehrung des Leberparenchyms ohne makroskopische Veränderung von Farbe und Konsistenz des Gewebes bezeichnet. Zur "Leberdegeneration" zählen alle sichtbaren Anzeichen einer Gewebeeränderung in Farbe und Konsistenz.

Tabelle 3: Histologischer Leberbefund im Vergleich mit positiven Ergebnissen des Latex-Agglutinations-Tests

	Sanität (160 = 100 %)	Normalschlachtung (190 = 100 %)
Latex-positiv	16(10,0%)	24(13,0%)
histologisch verändert	9(5,6%)	10(5,2%)
ohne histolog. Befund	7(4,3%)	14(7,3%)

Da die histologischen Befunde sehr unterschiedlicher Art waren, war eine tabellarische Erfassung dieser speziellen Diagnosen nicht möglich. Es werden deshalb die einzelnen Befunde der Latex-positiven Leberproben wiedergegeben. Die Latex-negativen Leberproben wiesen ähnliche histologische Befunde auf. Die prozentuale Verteilung zwischen histologisch veränderten und unveränderten Lebern war bei den Latex-negativen und Latex-positiven Proben nahezu gleich.

Histologische Befunde der einzelnen Latex-positiven Leberproben aus der Sanität:

- a) Chronische Perihepatitis, pericholangiäre Rundzellinfiltrate, RES-Aktivierung, Granulozytenherde, Granulozyten in den Sinusoiden, wenig Fett in den einzelnen Kupfferzellen.
- b) Vorwiegend in Glissonschen Dreiecken lokalisierte dezente lymphoidzellige Infiltration.
- c) Vorwiegend in Glissonschen Dreiecken lokalisierte sehr dezente lymphoidzellige Infiltration.
- d) Sehr geringe chronische Pericholangitis.
- e) Vorwiegend in Glissonschen Dreiecken sehr geringe lymphoidzellige Infiltration.
- f) Sehr dezente chronische Pericholangitis.

- g) Einzelne wenige lymphoidzellige Infiltrate in Glissonschen Dreiecken und im Parenchym.
- h) Geringe Rundzellproliferation in Glissonschen Dreiecken.
- i) Einzelne periportale Rundzellinfiltrate, wenige dezente lymphoidzellige Infiltrate im Parenchym.

Histologische Befunde der einzelnen Latex-positiven Leberproben aus Normalschlachtungen:

- a) Dezente lymphoidzellige Infiltration vor Glissonschen Dreiecken bei geringer Bindegewebsvermehrung.
- b) Dezente, vorwiegend in Glissonschen Dreiecken lokalisierte Infiltrate aus Rundzellen und eosinophilen Granulozyten.
- c) Einzelne wenige lymphoidzellige Infiltrate in Glissonschen Dreiecken.
- d) Geringgradige Zellproliferation in Glissonschen Dreiecken aus Granulozyten, Histiozyten und eosinophilen Granulozyten.
- e) Periphere kleintropfige Leber- und Kupfferzellverfettung, periportale Bindegewebszubildung.
- f) Vereinzelt dezente Rundzellinfiltrate.
- g) Vereinzelt dezente Rundzellinfiltrate.
- h) Vereinzelt dezente Rundzellinfiltrate.
- i) Einzelne lymphoidzellige Infiltrate im Parenchym und im Bereich Glissonscher Dreiecke, Anzeichen für leichte R-S-Aktivierung.
- j) In Glissonschen Dreiecken stellenweise geringe lymphoidzellige Infiltration.

Die folgenden graphischen Darstellungen geben die Leberenzymaktivität bei Latex-positiven und Latex-negativen Tieren wieder.

Abb. 1: SGOT-Aktivität

++++ = Latex-positiv

----- = Latex-negativ

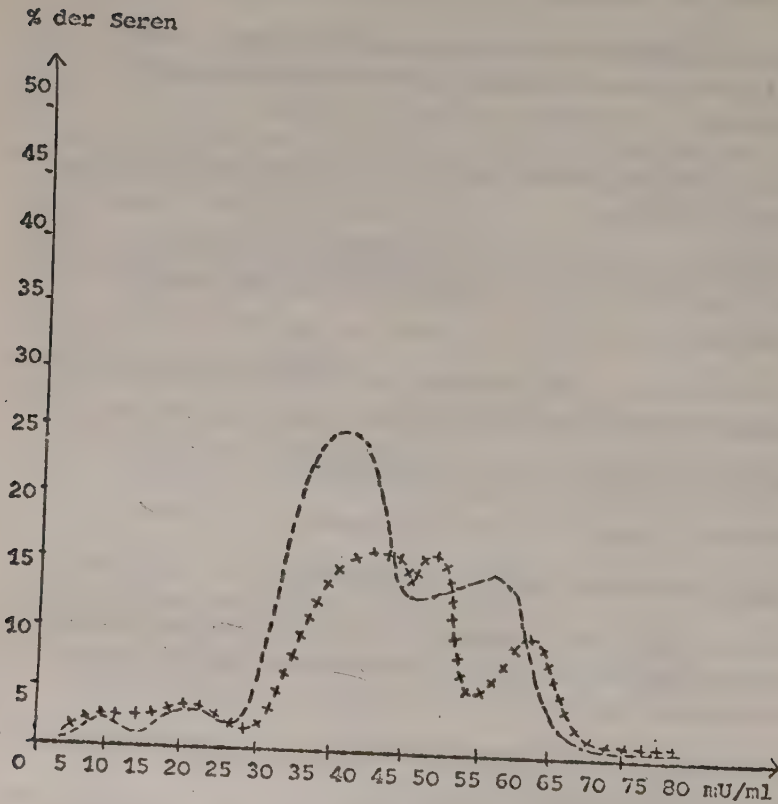


Abb. 2: SGPT-Aktivität

++++ = Latex-positiv

----- = Latex-negativ

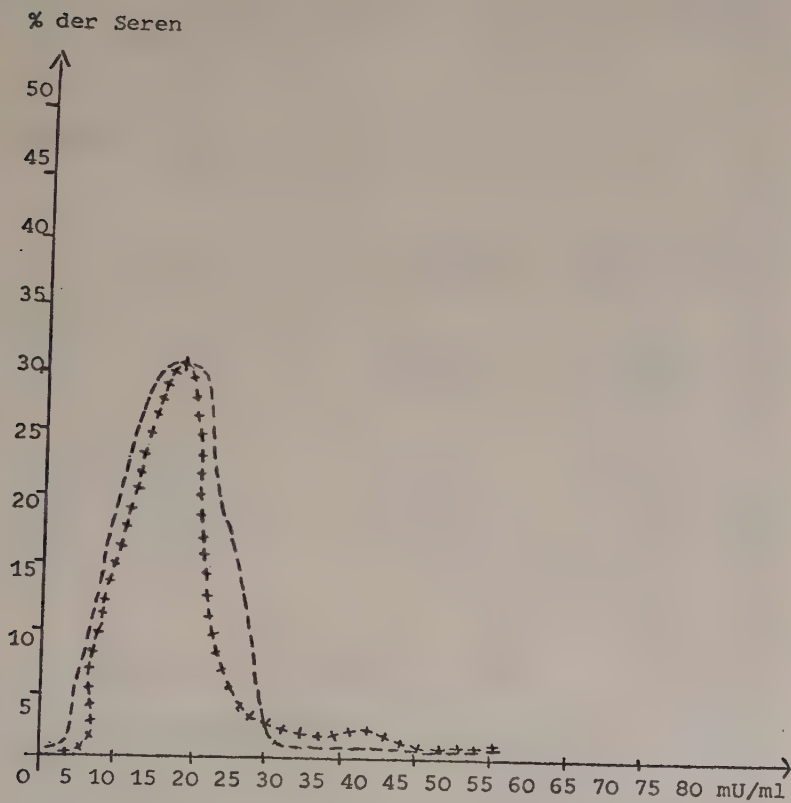
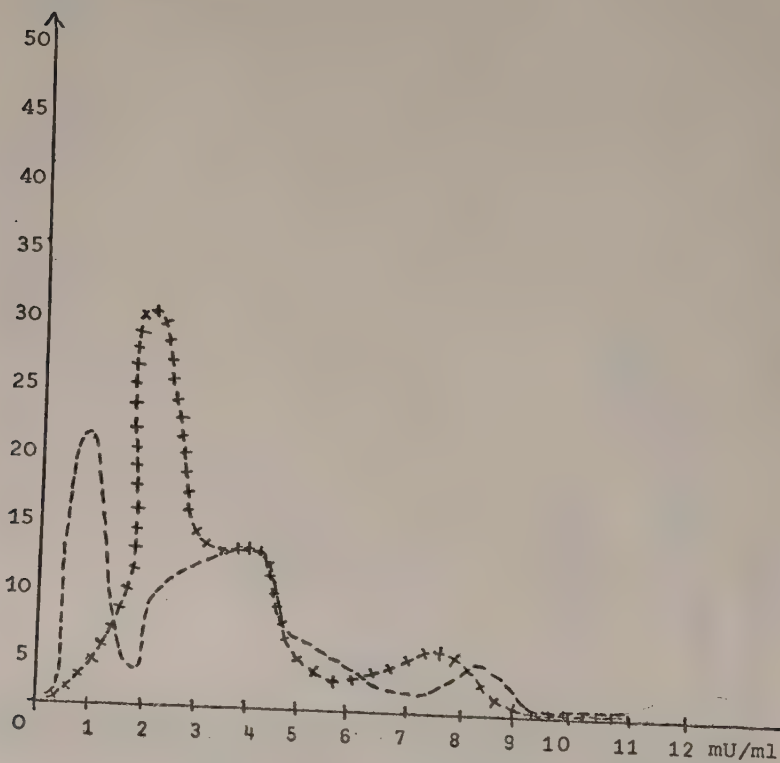


Abb. 3: GLDH-Aktivität

++++ = Latex-positiv

----- = Latex-negativ

% der Seren



Aus den Abbildungen 1 - 3 wird deutlich, daß sowohl bei Latex-positiven als auch -negativen Seren der größte Anteil im Normalbereich zu finden ist (SGOT: 10 - 50, SGPT: 6 - 13, GLDH: 1 - 3 mU/ml). Auffallend ist, daß die Werte für alle drei Enzyme sowohl bei positiven als auch bei negativen Seren häufig im äußersten Grenzbereich (SGOT um 50, SGPT 15 - 20, GLDH 3 - 5 mU/ml) liegen. Aktivitätserhöhungen kommen gleichermaßen bei "positiven" und "negativen" Seren vor.

Tabelle 4: Vergleich von Latex-Agglutinations-Test und Agar-Gel-Diffusion

	Sanität (160 = 100 %)	Normalschlachtung (190 = 100 %)
Latex-Test		
positiv	16(10%)	24(13%) (d=11,5%)
negativ	144(90%)	166(87%) (d=88,5%)
Agar-Gel-Diffusion		
Antigen-Nachweis	13(8%)	9(5%) (d= 6,5%)
Antikörper-Nachweis	24(15%)	9(5%) (d=10,0%)
Antigen und Antikörper-Nachweis	3(2%)	1(1%) (d= 1,5%)

d = durchschnittlich

Die Seren, bei denen in der Agar-Gel-Diffusion Antigene nachgewiesen wurden, waren auch beim Latex-Agglutinations-Test positiv, im Gegensatz zu den Seren, bei denen nur Antikörper nachgewiesen wurden, diese sind durchwegs Latex-negativ.

Tabelle 5: Latex-Befund in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht der Tiere

Alter	bis 1 J.		1 - 3 J.		3 - 7 J.		über 7 J.	
Geschlecht	m	w	m	w	m	w	m	w
Latex-Befund								
positiv	0%	0%	0%	1,1%	0,8%	2,9%	0%	5,2%
negativ	2,6%	2,3%	3,2%	3,7%	25,5%	18,9%	0%	33,8%

m = männlich

w = weiblich

Die Werte der vorstehenden Tabelle beziehen sich nur auf die 160 Tiere aus der Sanitätsanstalt.

Besprechung und Diskussion der Ergebnisse

Nach neueren Erkenntnissen werden neben parenteralen auch perkutane und orale Infektionen in die Ätiologie der Serumhepatitis eingeschlossen. Da nach statistischen Unterlagen eine relativ hohe Zahl der Hepatitiserkrankungen auf Gewerbetreibende entfällt, die sich mit der Verarbeitung von Lebensmitteln tierischer Herkunft befassen (27), wurden Schlachtrinder auf Vorhandensein des Hepatitis-B-Antigens untersucht. Damit sollte auch dem von HENNEBERG (31) ausgesprochenen Verdacht bezüglich der Existenz eines zoonotischen Hepatitis-reservoirs nachgegangen werden. Zugleich sollten die Australia-Antigen-Recherchen BLUMBERG's und seiner Mitarb. (17) an verschiedenen, in der Umgebung des Menschen lebenden Tieren in einer größeren Felduntersuchung bei einer Tierart fortgesetzt werden, zumal MELARTIN und BLUMBERG (49) bei Verabreichung von HAA-positivem Serum hämophiler Patienten an Kaninchen kurzfristig eine Produktion von spezifischen Antikörpern beobachtet haben. Die Frage, ob ein spezifischer Antigen-Antikörperkomplex, der durch Absorption des im Kaninchenserum gebildeten Antikörpers an das HAA-positive Patientenserum entsteht, in jedem Falle auch schon das infektiöse Agens der Serumhepatitis selbst in seinem Bindungsbereich einbezieht, ist offen (77).

350 stichprobenartig ausgewählte Schlachtrinder wurden auf das Vorkommen von HAA und dessen korrespondierendem Antikörper untersucht. Eine eingehende Untersuchung der schlachtfrischen Lebern - die der Biopsie vergleichbare Verhältnisse boten - war ebenfalls vorgesehen, um zu klären, ob zwischen HAA-Vorkommen bei Rindern und deren Leberbefunden ein Zusammenhang besteht. Nachteilig war es, daß Seren- und Lebergewebe nur einmal untersucht werden konnten, Veränderungen des Transaminasentiters und des histologischen Leberbefundes also nicht zu erfassen waren. Die nach Blutentzug der Rinder anfallenden Seren wurden unverzüglich mit dem Latex-

Test vorgetestet. Dabei mußte die in der Literatur (4, 39) erwähnte Problematik der "falsch-positiven" Ergebnisse zunächst in Kauf genommen werden. Da "falsch-negative" Resultate dagegen bisher nicht beschrieben wurden, konnte durch den Latex-Test eine Aussonderung von Nichtreagentenseren erwartet werden. Das ermittelte Ergebnis von 11,5 % an positiven Seren war unvermutet hoch.

Nun lehrt die allgemeine Erfahrung, daß durch das Prinzip der Latex-Antigen-Bindung die Sensibilität der Reaktionsfähigkeit bei der Agglutination vermehrt wird. Allerdings scheint umgekehrt proportional ihre Spezifität abzunehmen. Durch den Polymerisationseffekt der Antigenbindung an Latex-Partikeln entsteht offensichtlich eine verstärkte Abhängigkeit gegenüber physikalischen Einflüssen.

In Anbetracht dieser Problematik des Latex-Tests wurde ein Teil der im ersten Untersuchungsgang positiv ausgefallenen Seren verschiedenen Behandlungen wie Erhitzen, Verdünnen und Filtern unterzogen und der Test mit diesen vorbehandelten Seren wiederholt. Damit sollte überprüft werden, inwieweit der Latex-HAA-Agglutinationstest durch bestimmte Behandlungen der Seren beeinflusst wird. 20 im unbehandelten Zustand positive Seren reagierten ab einer Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:8 und höher negativ (Tab. 1). Durch Erhitzen wurde der Latex-Test nicht beeinflusst. Nach dem Filtrieren der Seren bei Porengröße 20 nm war das Ergebnis deutlicher abzulesen als bei unfiltrierten Seren. Das Filtern müßte die Störfaktoren ausschalten und dem Serum Partikel entziehen, die positive Reaktionen vortäuschen könnten.

Alle Seren wurden zusätzlich mit einer weiteren Methode, der Agar-Gel-Diffusion nach OUCHTERLONY, untersucht. Um gleichzeitig Antigen und Antikörper nachweisen zu können, wurde die Doppeldiffusion angewendet (13, 49). Der Prozentsatz der Antigen-positiven Tiere war mit dieser Methode etwas niedriger als beim Latex-Test, er betrug im Durchschnitt

6,5 % gegenüber 11,5 % beim Latex-Test. Zusätzlich wurden bei der Agar-Gel-Diffusion in 10 % der Seren Antikörper gegen das Australia-Antigen festgestellt.

Da die industrielle Herstellungsweise aufgrund vorausgegangener Hochreinigung der Seren das Vorhandensein isopräzipitierender Antikörper gegen Rinderglobulin praktisch ausschloß, mußte davon ausgegangen werden, daß es sich um eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion handelte.

Das Auftreten von entweder nur Antigen oder nur Antikörpern wird durch die Reaktionslage des Organismus leicht verständlich: Dem Stadium der "Virämie" (Antigen-Nachweis) folgt die Reaktion des Organismus, er produziert Antikörper. Kurzzeitig können Antigen und Antikörper (1,5 % der Fälle) im Serum nachgewiesen werden. Dann verschwindet das Antigen aus dem Blut - es tritt die Phase der Organmanifestation ein oder es kommt zum Erliegen der Infektion (Antikörper-nachweis) (Tab. 4).

Die unterschiedliche Anzahl der Australia-Antigen-positiven Seren beim Latex-Test und bei der Agar-Gel-Diffusion kann auf verschiedenen Ursachen beruhen. Es wäre zunächst möglich, daß die Empfindlichkeit des Latex-Tests, die ja der Elektrophorese entsprechen soll (18), tatsächlich größer ist als diejenige der Agar-Gel-Diffusion. Zum anderen kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, daß beim Latex-Test "falsch-positive" Ergebnisse durch "Isoimmunogene" vorkommen können. So ist z.B. bekannt, daß bei der Testung menschlicher Seren mit dem Latex-Test der im Blut mancher Menschen vorkommende Rheumafaktor ein positives Ergebnis vortäuschen kann. Es handelt sich dabei um ein makromolekulares Gamma-globulin, das im Serum von Menschen, die an primärer chronischer Polyarthrititis leiden, vorkommt. Es ist nicht bekannt, ob beim Rind vergleichbare Globulin-Faktoren existieren. Auch Konglutinine des Rinderserums könnten ähnliche Reaktionen hervorrufen, allerdings würde es sich dann um Partikel handeln, die nicht größer als 20 nm sind (Tab. 1).

Eine Störung der Agar-Gel-Diffusion durch den "Rheumafaktor" des Menschen ist nicht bekannt. Zwar ist auch nicht geklärt, ob die Agar-Gel-Diffusion, soweit sie bisher zur Testung menschlicher Seren auf Australia-Antigen verwendet wurde, analog bei Tierseren anwendbar ist. Man wird jedoch auch hier davon ausgehen können, daß ein Antigen nur mit dem korrespondierenden Antikörper reagiert und umgekehrt. Da für das Rind beim Australia-Antigen bisher keinerlei Kreuzreaktionen beobachtet worden sind, kann unterstellt werden, daß die Agar-Gel-Diffusion auch für das Rind spezifisch ist und ein positives Ergebnis für das Vorkommen von Australia-Antigen und Antikörpern im Rinder Serum spricht. Daß beim Latex-Agglutinations-Test 11,5 % der Tiere positiv reagierten, mag in "falsch-positiven" Ergebnissen mitbegründet sein; daß aber 6,5 % der gleichen Seren auch bei der parallel durchgeführten Agar-Gel-Diffusion positiv waren, gibt zu denken und bedarf der Abklärung.

Eine Abhängigkeit des Vorkommens von Australia-Antigen von Alter und Geschlecht der untersuchten Tiere konnte festgestellt werden. Von den Tieren mit positivem Australia-Antigen-Nachweis waren über 50 % älter als 7 Jahre, etwa ein Drittel war zwischen 3 und 7 Jahre alt, bei Tieren unter einem Jahr ergab sich kein positiver Nachweis. Die positiven Tiere waren außerdem größtenteils weiblich. Es ist jedoch fraglich, ob hier tatsächlich eine signifikante Abhängigkeit vom Geschlecht der Tiere vorliegt, da es sich bei älteren Schlachtrindern (über 7 Jahre) fast immer nur um Kühe handelt. Bullen oder Ochsen dieses Alters gelangen seltener zur Schlachtung (Tab. 5).

Eine Beziehung zwischen dem positiven Australia-Antigen-Nachweis und den makroskopisch festgestellten Leberveränderungen bestand nicht. Während die Rinder mit beanstandeten, d.h. makroskopisch veränderten Lebern fast ausschließlich aus der Sanität des Schlachthofs München stammten, war die Anzahl der positiven Tiere bei Sanitäts- und Normalschlachtungen nicht unterschiedlich (Tab. 2). Auch der

prozentuale Anteil der histologisch veränderten Lebern war nahezu gleich groß. Hier waren ebenfalls keinerlei Beziehungen zwischen positivem Antigenbefund und bestimmten Leberveränderungen erkennbar.

Kein Unterschied ergab sich zwischen Australia-Antigen-positiven und -negativen Tieren bezüglich der gemessenen Enzymaktivitäten. Auffallend ist, daß in allen Fällen die Enzymaktivität häufig an der oberen Grenze zu finden ist (SGOT: normal 10 - 50, häufig um 50; SGPT: normal 6 - 13 (40, 67), häufig bei 15 - 20 mU/ml). Es ist nicht bekannt, welchen Einfluß möglicherweise Stressoren wie Transport, Hunger und Schlachtvorgang auf die Enzymaktivitäten haben. Man kann annehmen, daß die festgestellten geringgradigen Enzymaktivitätserhöhungen bei sonst gesunden Tieren auf die genannten Streßfaktoren zurückzuführen sind (Abb. 1 - 3).

Abgesehen davon, daß inzwischen noch differenziertere Untersuchungsmethoden wie z.B. der Radio-Immun-Test eingesetzt werden, um positive Reaktionen auf HAA und korrespondierende Antikörper abzusichern, bleibt die Frage bestehen, inwieweit positiv reagierende Rinder eine Infektionsquelle für die Virushepatitis des SH-Typs darstellen können. Wie die Ergebnisse zeigen, weisen die HAA-positiven Tiere keine Anzeichen einer Hepatitiserkrankung auf. Es konnte weder ein Zusammenhang mit makroskopischen oder mikroskopischen Leberveränderungen aufgezeigt werden, noch sprechen die Leberenzymwerte dieser Tiere eindeutig für das Vorhandensein einer Hepatitis.

Personen aus fleischverarbeitenden Betrieben scheinen jedoch relativ häufig an Hepatitis zu erkranken, wie anhand von statistischen Unterlagen am Münchner Gesundheitsamt festgestellt wurde (27). Freilich ist die Zahl der latent infizierten oder gesunden Träger und möglichen Ausscheider von Hepatitis-B-Viren aus diesem Personenkreis nicht bekannt. Rückschlüsse würden auch hier Untersuchungen auf HAA in Blut und Ausscheidungen von klinisch hepatitisverdächtigen Gewerbetreibenden ermöglichen.

Zwar verbietet der Gesetzgeber in § 17 BSG den Personen, die an "infektiöser Hepatitis" erkrankt oder der Erkrankung verdächtig sind, die Beschäftigung in Betrieben, die mit der gewerbsmäßigen Gewinnung, Herstellung oder Bearbeitung von Fleisch und Fleischerzeugnissen oder mit dem Inverkehrbringen dieser Lebensmittel in loser Form befaßt sind. Damit ist, wie schon ausgeführt, der Gesamtkomplex der Virushepatitis, also IH und SH, angesprochen. Bisher sind aber keine Daten bekannt, die über ein Vorkommen von Australia-Antigen als Indikator für das Vorhandensein einer Infektion mit Serumhepatitis in diesem Personenkreis Aufschluß geben (8). Eine Handhabe zur Überprüfung bietet § 18 BSG. Es könnten beispielsweise bei den Einstellungs- und Wiederholungsuntersuchungen unter anderem auch Tests auf Australia-Antigen durchgeführt werden und auf diese Weise die Träger und möglichen Überträger von Serumhepatitis erfaßt werden. Da der Latex-Test hierfür als Screening-Verfahren aufgrund seiner umstrittenen Spezifität nicht mehr infrage kommt, wären zentralisierte Untersuchungen (Gegenstrom-Elektrophorese und Radio Immuno-Assay) anzustreben. Bekämpfungsmaßnahmen, z.B. prophylaktische Impfung mit Gammaglobulin, müßten im Falle erhöhter Ansteckungsgefahr eingeplant werden (52, 58). Sehr viel schwieriger ist es, eine Aussage zu machen über die möglichen Infektrisiken für den Verbraucher. Es ist z.B. nicht bekannt, welchen Einfluß Fleischreifung und Fleischlagerung auf das Australia-Antigen bzw. das mit ihm assoziierte Hepatitis-B-Virus haben und inwieweit Fleischprodukte noch infektiös sein können (21). In diesem Zusammenhang ist die Hepatitis-Epidemie von 1963 (6) in Erinnerung zu bringen, welche nachweislich auf den Genuß halbroher Bratwürste anläßlich einer Kirchweih zurückgeführt wurde und bei welcher 200 Personen an Hepatitis erkrankten. Dabei konnte nicht geklärt werden, ob der Erreger, über dessen Identität s.Z. noch keine Aussage möglich war, durch Fleisch, andere Zutaten oder durch eine infizierte Person nachträglich bei der Herstellung in die Wurstmasse gelangte. Die Schwierigkeiten bei der Aufklärung solcher Fälle bestehen

darin, daß zum Zeitpunkt des Ausbruchs der Massenerkrankung das die Infektion auslösende Nahrungsmittel nicht mehr ausfindig gemacht werden kann. Deshalb muß versucht werden, eine angenommene Infektkette schon vorher zu unterbrechen. Eine Maßnahme dafür wäre die vorgeschlagene Untersuchung klinisch verdächtiger Angehöriger des einschlägigen Personals auf Australia-Antigen. In Verdachtsfällen sollten Schlachttiere im Herkunftsbestand untersucht werden. Außer Rindern wäre dann auch die Untersuchung anderer Schlachttiere wie Schweine und Geflügel in Betracht zu ziehen. Weitere Ermittlungen müßten sich auf den Einfluß der Lagerung, Reifung und Verarbeitung auf antigenhaltiges Fleisch erstrecken.

Schließlich sind Untersuchungen notwendig zur Erarbeitung geeigneter Behandlungsverfahren für infektionsverdächtige Lebensmittel, die der hohen Resistenz des mutmaßlichen Erregers Rechnung tragen. Seit langem unterstützt die WHO Forschungsarbeiten, die zum Ziel haben, den Umfang der Übertragungsmöglichkeit der infektiösen Hepatitis auf dem Wasserweg abzuklären, um geeignete Verhütungspläne anzubieten. Nach den neuesten Erkenntnissen ist insbesondere das Virus der Hepatitis-B in diese Planungen einzubeziehen. Primär ist hierbei eine Untersuchung von Schalentieren und Fischen interessant. Schalentiere kommen nachweislich als eine der Infektionsquellen auch für Serumhepatitis infrage; sie können als "Indikatoren" für Hepatitisverseuchungen betrachtet werden, da sie aus abwasserverseuchten Buchten gewonnen werden (76). Der Gedanke liegt nahe, daß neben den Schalentieren auch Fische von solchen Buchten Überträger des infektiösen Agens der Hepatitis-B sein können. Ihre Untersuchung auf das Hepatitis-Assoziierte-Antigen wurde bisher vernachlässigt, könnte aber von Bedeutung sein, da auch die Serumhepatitis auf oralem Weg übertragbar ist. Ein Anhaltspunkt dafür ist die Tatsache, daß z.B. in der gesunden Bevölkerung der Mittelmeerländer (Italien, Griechenland) Australia-Antigen wesentlich häufiger gefunden wird als in der Bevölkerung anderer Länder (1). Ähnliche Feststellungen

liegen über die Anwohner außereuropäischer Küstenstriche vor.

Unbeachtet ist bisher auch die Frage geblieben, ob Parasiten, die mit Antigen-infiziertem Abwasser in Verbindung gelangen - womöglich über Zwischenwirte wie z.B. bei Leberegeln bestimmte Schneckenarten - bei der Invasion von schlachtbaren Haustieren oder jagdbarem Wild als Vektoren für die Infektion mit dem Virus der Hepatitis-B des Menschen infrage kommen.

Schl u ß b e t r a c h t u n g

Die vorliegenden Untersuchungen greifen eine seit 1961 gestellte Forderung von BLUMBERG (3), dem Entdecker des Australia-Antigens (HAA: Hepatitis-Assoziiertes-Antigen, HBA: Hepatitis-B-Antigen), auf, das Vorkommen dieses "Indikator-Antigens" zum Nachweis der Serumhepatitis des Menschen auch bei Haus- und Versuchstieren zu überprüfen.

Da in dieser Arbeit beschrieben wurde, daß im HAA-Latex- und -Immuno-Diffusions-Test zu 11,5 % bzw. 6,5 % positive Reaktionen bei Stichprobenuntersuchungen zu beobachten waren, sind nun verstärkte Anstrengungen in bezug auf eine Neuorientierung über das Infektionsreservoir der Serumhepatitis empfehlenswert.

Bei den HAA-positiven Tieren ließen sich keine Anzeichen einer Hepatitiserkrankung nachweisen. Typische Reaktionen des Leberzellgewebes im Enzymaktivitätstest, begleitet von makroskopischen und histologischen Leberveränderungen, fehlten.

Es bleibt also weiterhin ein über den Menschen und verschiedene Primaten hinausgehendes Wirtsspektrum infrage gestellt. Nicht vernachlässigt werden dürfen jedoch prophylaktische Maßnahmen zur Verhinderung einer "Vehiculuminfektion" durch zeitweilige Gewebshaftung prä- und postmortem. Konsequenzen für Gewerbetreibende und Konsumenten sind in die Überlegungen einzubeziehen.

Seitdem durch den Nachweis von Hepatitis-Assoziiertem-Antigen Rückschlußmöglichkeiten auf das Vorkommen von Serumhepatitis bestehen, ist die Anwendung des Pauschalbegriffs "infektiöse Hepatitis" im Sinne § 3 BSG für Nahrungsmittelhepatitis und Serumhepatitis zugleich nicht mehr zu vertreten. Dies würde jedoch besondere Aufmerksamkeit für bisher weniger beachtete Infektionswege des Erregers der Serumhepatitis erfordern. Die Infektion erfolgt nicht nur perkutan, parenteral oder oral auf direktem Wege (Mensch - Mensch),

sondern auch zyklisch (Mensch - Tier - Mensch), möglicherweise unter Einschaltung eines Zwischenwirts (Mensch - Abwasser - Schalentiere - Mensch) oder sogar zusätzlich wie in Fällen von Distomatose über den Infektionsweg (Mensch - Wasser - Parasit - Haustier - Mensch).

Diese Infektionswege sind wahrscheinlich, da

- a) das Hepatitis-Assoziierte-Antigen (und damit auch u.U. das SH-Virus) in menschlichen Ausscheidungen (Urin, Stuhl, Menstruationsblut) sowie im Abwasser nachgewiesen wurde,
- b) orale Infektionen mit dem SH-Virus bekannt sind und
- c) dem SH-Virus eine sehr hohe Resistenz zugesprochen wird.

Zu bedenken ist außerdem, daß SH-Virus-Infektionen beim Menschen sehr häufig subklinisch verlaufen und deshalb mit einer hohen Dunkelziffer gerechnet werden muß.

Z u s a m m e n f a s s u n g

1. Es wird ein Überblick gegeben über die bisherige Hepatitis-Forschung. Seit der Entdeckung des Australia-Antigens besteht die Möglichkeit einer Differenzierung zwischen Nahrungsmittelhepatitis und Serumhepatitis. Verschiedene Nachweismethoden für das Australia-Antigen werden besprochen.
2. Zur schnellen Vortestung der Seren wurde der Latex-Agglutinations-Test gewählt. Durch verschiedene Vorbehandlungen der Seren wurde die Beeinflußbarkeit dieses Tests überprüft. Zum Nachweis von Australia-Antigen und Antikörpern wurden die Seren zusätzlich mit der Agar-Gel-Diffusion getestet.
3. 350 Schlachtrinder (190 aus Normalschlachtungen, 160 aus der Sanitätsanstalt) wurden auf das Vorkommen von Australia-Antigen geprüft. Es konnten mit dem Latex-Test 11,5 % und mit der Agar-Gel-Diffusion 6,5 % der Tiere als Träger von Australia-Antigen ermittelt werden. Bei den Australia-Antigen-positiven Tieren konnten keine Anzeichen einer Hepatitis festgestellt werden. Weder makroskopische und histologische Leberuntersuchungen noch die Prüfung der Leberenzymaktivitäten ergaben Anhaltspunkte für das Vorliegen einer Lebererkrankung der Tiere. Ein deutlicher Zusammenhang war nur zwischen dem Vorkommen des Antigens und dem Alter der untersuchten Tiere erkennbar. Das Australia-Antigen konnte in der Regel nur bei älteren Rindern (3 - 7 Jahre und älter) festgestellt werden.
4. Inwieweit die positiven Tiere eine Infektionsquelle für den Menschen bilden, bleibt ungeklärt. Weiterhin ist nicht bekannt, in welchem Maß Fleisch und Fleischprodukte solcher Rinder infektiös sein können und welchen Einfluß Lagerung, Reifung und Verarbeitung des Fleisches auf die Infektiosität des Erregers haben.

5. Der Begriff "infektiöse Hepatitis" im Sinne §§ 3 und 17 BSG ist seit der Möglichkeit der Differenzierung von Serum- und Nahrungsmittelhepatitis durch den Nachweis von Australia-Antigen nicht mehr vertretbar.
6. Als Möglichkeit der Bekämpfung der Hepatitis ist zu fordern, Personal aus den in § 17 BSG genannten Betrieben routinemäßig auf Australia-Antigen zu überprüfen. Ebenso sollten neben Rindern auch andere zum menschlichen Genuß geeignete Tiere auf Australia-Antigen getestet werden.

S u m m a r y

1. A survey is given of previous research about hepatitis. The discovery of Australia-Antigen has made it possible to differentiate between food borne hepatitis and serum hepatitis. Different methods for the identification of Australia-Antigen are discussed.
2. As a quick screening test the latex-agglutination-test was selected. The influence of different preliminary treatments of sera on the latex-test were studied. To identify Australia-Antigen and antibodies the sera were additionally tested with agar-gel-diffusion.
3. In the present study 350 slaughtered cattle were examined for Australia-Antigen and 11,5 % were found to be positive for the antigen with the latex-test while 6,5 % were found with the agar-gel-diffusion. No signs were found that the positive reacting cattle were infected with hepatitis. Neither meat control of the liver, nor the histological examination, nor the transaminase-activity gave evidence of a hepatitis infection of the cattle. A correlation was found between the presence of Australia-Antigen in serum and the age of the examined cattle. The age distribution was striking in that the antigen was extremely rare in animals under 3 years and more frequent in ages greater than 7 years.
4. To what extent cattle are carriers of the virus hepatitis and thus a source of the infection remains unknown. Further there is no evidence to what extent meat and meat products are infectious and what influence storing, curing and treatment of the meat have on the infectivity of the antigen.
5. The term "infectious hepatitis" in the sense of §§ 3 and 17 BSG¹⁾ is no longer tenable since it is possible to differentiate between serum- and food borne hepatitis.

1) (Bundesseuchengesetz): West German special law-regulations for prophylaxis of diseases.

6. As a possible preventative measure against hepatitis it must be required that suspected persons in the business mentioned in § 17 BSG be routinely tested for the presence of Australia-Antigen. In addition to cattle other animals which are appropriate for human nutrition should be tested for Australia-Antigen.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. Abar, B.:

Untersuchungen über die Reinigung und Konzentrierung des Australia-Antigens zur Herstellung von monospezifischen Antiseren.

Diss. rer. nat. München 1973

2. Allison, A.C. and Blumberg, B.S.:

Isoprecipitation reaction distinguishing human serum-protein types.

Lancet I 1961, 634

3. Alter, H.J. and Blumberg, B.S.:

Further studies on a "new" human isoprecipitin system (Australia-Antigen).

Blood 27 (1966), 297

4. Alter, H.J., Polesky, H.F. and Holland, P.V.:

False positive tests for hepatitis-associated antigen in blood donors caused by antibodies to ruminant serum proteins.

J. Immunol. 108 (1971), 358

5. Anders, W.:

Zur epidemiologischen Situation der Hepatitis infectiosa in der Bundesrepublik Deutschland.

Bundesgesundheitsblatt 3 (1960), 389

6. Anders, W. und Gässlein, F.:

Eine Nahrungsmittelerpidemie von Hepatitis infectiosa.

Bundesgesundheitsblatt 7 (1964), 245

7. Apostolov, K., Bauer, D.J., Selway, J.W.T., Fox, R.A., Dudley, F.J. and Sherlock, S.:

Australia-Antigen in urine.

Lancet I 1971, 1274

8. Arnold, H.:
Zur Epidemiologie und Prophylaxe der Hepatitis infectiosa.
Der öffentliche Gesundheitsdienst 1 (1962), 16
9. Barker, L.F., Smith, K.O., Grhle, W.D. and Shulman, N.R.:
Some antigenic and physical properties of virus-like
particles in sera of hepatitis patients.
J. Immunol. 102 (1969), 1529
10. Barker, L.F., Shulman, N.R., Murray, R., Hirschman, R.J.,
Ratner, F., Diefenbach, W.C. and Geller, H.M.:
Transmission of serum hepatitis. Evidence of association
with 20 virus-like particles.
J. Amer. Med. Ass. 211 (1970), 1509
11. Bassewitz, D.B.:
Australia-Antigen bei Patienten mit chronischen Leberer-
krankungen.
Med. Welt 23 (1972), 1696
12. Bayer, M.E., Blumberg, B.S. and Werner, B.:
Particles associated with Australia-Antigen in the sera
of patients with leukemia, Down's syndrome and hepatitis.
Nature (Lond.) 218 (1971), 1057
13. Becker, W., Bonacker, L. und Schwick, H.G.:
Ein einfacher immunologischer Schnelltest zum Nachweis
des Au/SH-Antigens.
Klin. Wschr. 48 (1970), 887
14. Berg, P.A.:
Hepatitis-Assoziiertes-Antigen (HAA): Klinische und im-
munologische Bedeutung.
Klin. Wschr. 50 (1972), 125
15. Blaine, J.D., Earle, A., Flewett, T.H. and Williams, L.K.T.:
Is the urine infective in serum hepatitis?
Lancet I 1971, 797

16. Blumberg, B.S., Alter, H.J. and Visnick, S.:
A "new" antigen in leukemia sera.
J. Amer. Med. Ass. 191 (1965), 541
17. Blumberg, B.S., Sutnick, A.J. and London, W.T.:
Hepatitis and leukemia - their relation to Australia-Antigen.
Bull. N.Y. Acad. Med. 44 (1968), 1576
18. Bonacker, L. und Stärk, J.:
Latex-Agglutination, eine schnelle Screening-Methode zum Nachweis des "Hepatitis Associated Antigen".
Klin. Wschr. 50 (1972), 166
19. Brühl, W.:
Leber- und Gallenwegserkrankungen.
Verlag Georg Thieme, Stuttgart 1964
20. Bühlmeier, G.:
Zur Problematik der versicherungsmedizinischen Beurteilung der Hepatitis infectiosa als Berufskrankheit.
Bundesgesundheitsblatt 3 (1960), 389
21. Cliver, D.D.:
Food-associated-viruses.
Health Lab. Sci. 4 (1967), 213
22. Cossart, Y.E. and Vahrman, J.:
Studies of Australia-SH-Antigen in sporadic viral hepatitis in London.
Brit. Med. J. 1 (1970), 403
23. Dane, D.S., Cameron, C.H. and Briggs, M.:
Virus-like particles in serum of patients with Australia-Antigen associated hepatitis.
Lancet I 1970, 695

24. Dudley, F.J., Fox, R.A. and Sherlock, S.:
Relationship of hepatitis-associated-antigen (HAA) to
acute and chronic liver injury.
Lancet I 1971, 1
25. Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z. and Purcell, P.H.:
Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of
a virus-like antigen associated with acute illness.
Science 182 (1973), 1026
26. Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z., Gerin, J.L., Purcell, R.H.:
Buoyant density of the hepatitis A virus - like particle
in cesium chloride.
J. Virol. 13 (1974), 1412
27. Geiger, G., Handlos, B. und Winter, H.:
Das Infektionsrisiko durch Virushepatitis bei der Fleisch-
verarbeitung.
Schlacht- und Viehof-Ztg. 74 (1974), 3
28. Germain, K.J., Sturdivant, S.K. and Rightsel, W.A.:
Evaluation of a red cell agglutination test for detection
of Australia-Antigen (HBAg).
Appl. Microbiol. 25 (1973), 524
29. Gocke, D.J. and Kavey, N.B.:
Hepatitis antigen: Correlation with disease and infectivi-
ty of blood donors.
Lancet I 1969, 1055
30. Gocke, D.J. and Howe, C.:
Rapid detection of Australia-Antigen by counterimmuno-
electrophoresis.
J. Immunol. 104 (1970), 1031
31. Henneberg, G.:
Zum Problem der Ätiologie der Hepatitis infectiosa.
M. Med. Wschr. 48 (1967), 2525

32. Hirschman, S.Z., Vernace, S.J. and Schaffner, F.:
D.N.A. Polymerase in preparations containing Australia-Antigen.
Lancet I 1971, 1009
33. Horst, H., Tripatzis, J. und Konstantinidis, J.:
Australia-Antigen: Wirkung chemischer und physikalischer
Maßnahmen auf die Antigenität.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. A 219 (1972), 1
34. Jokelainen, P.T., Krohn, K., Prince, A.M. and Finlayson,
N.D.C.:
Electron microscopic observation on virus-like particles
associated with SH-Antigen.
J. Virol. 6 (1970), 685
35. Kaplan, M.M. and Grady, G.:
Serum-hepatitis-antigen in chronic hepatitis and primary
biliary cirrhosis.
Lancet I 1971, 159
36. Kapp, J.F. und Kuwert, E.:
Quantitative Bestimmung des Australia-(Au-SH)Antigens
und klinischer Verlauf der Serumhepatitis.
Klin. Wschr. 50 (1972), 266
37. Kissling, R.E.:
Laboratory status in transmission of infectious hepatitis
agens.
in: Berg, G.: Transmission of viruses by the water route.
Interscience Publishers, New York, London, Sydney 1966,
337
38. Kissling, R.E. and Barker, L.F.:
Evaluation of assay methods for hepatitis associated
antigen.
Appl. Microbiol. 23 (1972), 1037

39. Kley, S.:
Falsch-positive Ergebnisse mit dem Latexfixationstest
auf Australia-(SH)Antigen durch Medikamente.
Dtsch. Med. Wschr. 97 (1972), 1547
40. Kraft, H.:
Labormethoden der Veterinärmedizin bei Haussäugetieren.
Parke-Davis and Co., Veterinärabteilung, München 1962
41. Krugman, S.K. and Giles, J.P.:
Viral hepatitis: New light on an old disease.
J. Amer. Med. Ass. 212 (1970), 1019
42. Krugman, S.K. and Hammond, J.:
Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection.
J. Amer. Med. Ass. 200 (1967), 365
43. Leach, J.M. and Ruck, B.J.:
Detection of hepatitis associated antigen by the Latex-agglutination-test.
Brit. Med. J. 4 (1971), 597
44. Leutner, R.:
Meldepflichtige Krankheiten 1971.
Wirtschaft und Statistik 5 (1972), 276
45. Löffler, F.:
in: Rolle, M. und Mayr, A.: Mikrobiologische und allgemeine Seuchenlehre.
Ferd. Enke Verlag, Stuttgart 1966, S. 21
46. London, W.T., Sutnick, A.J. and Blumberg, B.S.:
Australia-Antigen and acute viral hepatitis.
Ann. of Internal Med. 70 (1969), 55

47. Martin, W.:

Mikro-Überwanderungselektrophorese zum Nachweis des
Au-SH-Antigens im Serum.

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. A 223 (1973), 279

48. Maugh, T.H.I.:

Hepatitis: A new understanding emerges.

Science 176 (1972), 1225

49. Melartin, L. and Blumberg, B.S.:

Production of antibody against "Australia-Antigen" in
rabbits.

Nature (Lond.) 210 (1966), 1340

50. Millman, J., Zavatone, V., Gerstley, B.J.S. and Blumberg,
B.S.:

Australia-Antigen detected in the nuclei of liver cells
of patients with viral hepatitis by the fluorescent anti-
body technique.

Nature (Lond.) 222 (1969), 181

51. N.N.:

Gelbsuchtübertragung vom Schimpansen auf den Menschen in
den USA.

Bundesgesundheitsblatt 9 (1966), 29

52. N.N.:

Hepatitis infectiosa - Verhütung und Bekämpfung.

Merkbl. Nr. 21, Amtliche Veröffentlichungen des BGA zum
BSG, DÄV Juni 1972

53. N.N.:

Infektionen: Mensis insana.

Euromed 13 (1973), 737

54. N.N.:

Nachrichten: Arthropoden als Überträger der Serumhepatitis.

Euromed 13 (1973), 817

55. N.N.:
Hepatitis - ein unvermeidbares Risiko?
Ärztemerkblatt des Deutschen Grünen Kreuzes, Marburg/Lahn
56. Okochi, K. and Murakami, S.:
Observations on Australia-Antigen in Japanese.
Vox Sang. (Basel) 15 (1968), 374
57. Pesendorfer, F., Krassnitzky, O. und Wewalka, F.:
Immunelektrophoretischer Nachweis von "Hepatitis-Associated-Antigen" (Au/SH-Antigen).
Klin. Wschr. 48 (1970), 58
58. Podsedlovsky, T.S., Dilene, M.-D.Y. and Sprindzhyukene, D.Y.:
Experience in the use of gamma-globulin for prophylaxis of infectious hepatitis in adults.
Zh. Mikrobiol. (Moskau) 48 (1971), 42
59. Del Prete, S., Constantino, D. and Doglia, M.:
Different Australia-Antigen determinants in acute viral hepatitis.
Lancet II 1970, 1058
60. Prince, A.M.:
An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 60 (1968), 814
61. Prince, A.M.:
Relation of Australia- and SH-Antigens.
Lancet II 1968, 462
62. Prince, A.M. and Burke, K.:
Serum hepatitis antigen (SH): Rapid detection by high voltage immuno-electrophoresis.
Science 169 (1970), 593

63. Provost, P.J., Ittensohn, O.L., Villarejos, V.M.,
Arguedas, J.A. and Hilleman, M.R.:
Etiologic relationship of marmoset-propagated CR 326
hepatitis-A-virus to hepatitis in man.
Proceedings of the Society for Experimental Biology and
Medicine 1973 (in press)
64. Purcell, R.H., Holland, P.V., Walsh, J.H., Wong, D.C.,
Morrow, A.G. and Chanock, R.M.:
A complement fixation test for measuring Australia-Anti-
gen and antibody.
J. Infec. Dis. 120 (1969), 383
65. Purcell, R.H., Wong, D.C., Alter, H.J. and Holland, P.V.:
Microtiter solid-phase radioimmunoassay for hepatitis B
antigen.
Appl. Microbiol. 26 (1973), 478
66. Rolle, M. und Mayr, A.:
Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre.
Ferd. Enke Verlag, Stuttgart 1966
67. Rosenberger, G.:
Krankheiten des Rindes.
Verlag Paul Parey, Berlin/Hamburg 1970, 366
68. Sanwald, R., Diezel, G., Hellmann, K., Rapp, W. und
Tibor, L.:
Australia-Antigen-Träger - Klinische Befunde und Möglich-
keiten der Übertragung.
Therapie-Woche 22 (1972), 4417
69. Sanwald, R. und Sauerbruch, T.:
Australia-(SH)Antigen bei Blutspendern und Empfängern.
Dt. Med. Wschr. 95 (1970), 2153

70. Schmidt, N.J. and Lennette, E.H.:
Complement fixation and immunodiffusion tests for assay
of hepatitis associated "Australia" Antigen and antibodies.
J. Immunol. 105 (1970), 604
71. Schmidt, N.J., Gee, P.S. and Lennette, E.H.:
Relative sensivity of gel diffusion, complement fixation
and immunoelectric-osmo-phoresis. Tests for detection of
hepatitis associated antigen and antibody.
Appl. Microbiol. 22 (1971), 165
72. Schober, A. und Thomssen, R.:
Natur und Nachweis des Hepatitis-B-(Australia)Antigens
und seines Antikörpers.
Der Internist 14 (1973), 546
73. Shulman, N.R. and Barker, L.F.:
Virus-like antigen, antibody and antigen-antibody-complexes
in hepatitis measured by complement fixation.
Science 165 (1969), 304
74. Shulman, N.R., Hirschman, R.J. and Barker, L.F.:
Viral hepatitis.
Ann. Intern. Med. 172 (1970), 257
75. Sirtori, C.:
Australia-Antigen, Coronavirus and reverse transcriptase
in viral hepatitis.
The Lancet (1971), 261
76. Stille, W., Kunkel, B. und Nerger, K.:
Austernhepatitis.
Dt. Med. Wschr. 97 (1972), 145
77. Thamer, G.:
Das Australia-Antigen und seine klinische Bedeutung.
Dt. Med. Wschr. 99 (1974), 711

78. Tripatzis, J. and Horst, H.:
Detection of Australia-Antigen in urine.
Nature (Lond.) 231 (1971), 266
79. Tripatzis, J., Horst, H. und Konstantinidis, J.:
Australia-Antigen in Bett- und Leibwäsche von Hepatitis-
Patienten.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. A 222 (1972), 428
80. Vyas, G.N. and Shulman, N.R.:
Hemagglutination assay for antigen and antibody associa-
ted with viral hepatitis.
Science 170 (1970), 332
81. Vyas, G.N., Adelberg, S.G. and Perkins, H.A.:
Nonspecificity of hepatitis-B-antigen detected with jodine
125-labeled antibody.
Science 182 (1973), 1368
82. Wachendorfer, G.:
Das Agar-Präzipitationsverfahren: Seine Leistungen und
Grenzen in der Virus-Diagnostik.
Zbl. Vet. Med. B 12 (1965), 55
83. Weil:
in: Pschyrembel, W.: Klinisches Wörterbuch.
Verlag W. de Gruyter u. Co., Berlin 1969

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. L. Kotter möchte ich für die Überlassung des Themas, für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in seinem Institut und für die freundliche Unterstützung danken.

Meinen besonderen Dank auch an Herrn Akademischen Direktor Dr. G. Geiger für sein stetes Interesse an dieser Arbeit, die er jederzeit mit Rat und Tat bereitwillig unterstützt hat.

Danken möchte ich auch den Vorständen des Instituts für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie, Herrn Prof. Dr. J. von Sandersleben und Herrn Prof. Dr. E. Dahme, für ihre bereitwillige Übernahme der bei dieser Arbeit angefallenen histo-pathologischen Untersuchungen.

Für die Durchsicht der Arbeit und seinen freundlichen Rat danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. P. A. Bachmann.

Lebenslauf

Am 9. März 1948 wurde ich als Tochter des städtischen Oberamtsrats Otto Weindl und seiner Ehefrau Barbara, geb. Feneis in München geboren. Von 1954 bis 1958 besuchte ich die Volksschule an der Haldenbergerstraße in München und wechselte dann auf das neusprachliche Gymnasium der Englischen Fräulein in München-Nymphenburg über, an dem ich 1967 die Reifeprüfung ablegte.

Mit dem Wintersemester 1967/68 begann ich mein Studium an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität in München. Am 20. September 1972 beendete ich den 3. Teil der Tierärztlichen Prüfung. Meine Approbation erhielt ich mit Wirkung vom 28. November 1972.

Seit dem 1. März 1969 bin ich mit dem Tierarzt Michael Handlos verheiratet.

